



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA:  
DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS DISTINTOS ENCASTES  
DE LA RAZA ASÍ COMO LA CARACTERIZACIÓN DE LA  
ACTITUD COMPORTAMENTAL DE LA MISMA**

CHARACTERIZATION OF THE LIDIA CATTLE BREED:  
GENETIC DIFFERENTIATION OF DIFFERENT ENCASTES  
AND BEHAVIORAL ATTITUDE CHARACTERIZATION

TESIS DOCTORAL

**ROCÍO PELAYO GARCÍA**

Córdoba, Febrero de 2017

**TITULO:** *Caracterización genética de la raza bovina de Lidia:  
diferenciación genética de los distintos encastes de la raza así  
como la caracterización de la actitud comportamental de la misma*

**AUTOR:** *Rocío Pelayo García*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA:  
DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS DISTINTOS ENCASTES  
DE LA RAZA ASÍ COMO LA CARACTERIZACIÓN DE LA  
ACTITUD COMPORTAMENTAL DE LA MISMA**

**CHARACTERIZATION OF THE LIDIA CATTLE BREED:  
GENETIC DIFFERENTIATION OF DIFFERENT ENCASTES  
AND BEHAVIORAL ATTITUDE CHARACTERIZATION**

**MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR**

**ROCÍO PELAYO GARCÍA**

**Para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional  
por la Universidad de Córdoba**

**DIRECTORES**

Dra. Mercedes Valera Córdoba

Dr. Luis Royo Martín

Dr. Pedro J. Azor Ortiz

Córdoba, Febrero de 2017



TÍTULO DE LA TESIS: **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA: DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS DISTINTOS ENCASTES DE LA RAZA ASÍ COMO LA CARACTERIZACIÓN DE LA ACTITUD COMPORTAMENTAL DE LA MISMA.**

DOCTORANDO/A: **ROCÍO PELAYO GARCÍA**

**INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS Y EL TUTOR**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral que se presenta se ha elaborado a modo de “**compendio de publicaciones**”, al estar integrada por cuatro artículos publicados en revistas JCR, de gran impacto en el campo de la Ciencia Animal. La Tesis se ha estructurado en 3 bloques principalmente.

Capítulo 1: “**Caracterización genética, a partir de marcadores moleculares, de la raza bovina de Lidia**”. En el primer capítulo se ha abordado una caracterización molecular en el cromosoma Y para estudiar el origen filogenético de la raza bovina de Lidia y algunas de sus principales castas y encastes. Asimismo, con la ayuda de diferentes polimorfismos no estudiados hasta el momento en el cromosoma Y, se ha encontrado un nuevo haplogrupo presente únicamente en razas bovinas españolas y en algunas castas de Lidia. Este capítulo está integrado por dos trabajos:

- **Pelayo R**, Valera M, Molina A, Royo LJ. 2015. *Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain*. Animal Genetics, 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278
  - Impact Index: 1,779 (Journal Citation Report, 2015).
  - Subject and Quartile: Genetics and heredity, 1st quartile.
- **Pelayo R**, Penedo M.C.T, Valera M, Molina A, Ginja C, Royo L.J. 2016. *Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle*. Animal Genetics. DOI: 10.1111/age.12549. In press.
  - Impact Index: 1,779 (Journal Citation Report, 2015).
  - Subject and Quartile: Genetics and heredity, 1st quartile.

Capítulo 2: “**Sistema de calificación lineal estandarizada para evaluar el comportamiento en la raza Bovina de Lidia y estimación de parámetros genéticos**”. En el segundo capítulo

se ha puesto a punto un sistema de Calificación Lineal Estandarizada para evaluar el Comportamiento del toro durante el tentadero en ganadería (ficha CLEC). A partir de los datos recogidos utilizando la metodología CLEC se ha estimado los parámetros genéticos para los principales caracteres comportamentales de esta raza. Este capítulo está integrado por 1 trabajo:

- **Pelayo R**, Solé M, Sánchez M.J, Molina A, Valera M. 2015. *Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters. Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133(2016): 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198.
  - Impact Index: 1,745 (Journal Citation Report, 2015).
  - Subject and Quartile: Agriculture, Dairy and Animal Science, 1st quartile.

Capítulo 3: “**Estudio de polimorfismos asociados con la calidad de la carne en la raza Bovina de Lidia, como posible uso alternativo en el sistema de cría de esta raza**”. En el tercer capítulo se ha contemplado el estudio de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en varios cromosomas autosómicos de la raza bovina de Lidia (cromosoma 14 y 29) en tres genes relacionados con la terneza (*CAPN1* y *CAST*) y la infiltración grasa (*DGAT*). Este capítulo está integrado por 1 trabajo:

- **Pelayo R**, Valera M, Molina A, Avilés C 2016. *Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle*. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.
  - Impact Index: 0,760 (Journal Citation Report, 2015).
  - Subject and Quartile: Agriculture, multidisciplinary, 2<sup>nd</sup> quartile.

Por la presente autorizamos la presentación y defensa de esta Tesis Doctoral bajo la modalidad de “**compendio de publicaciones**”, para obtener el grado de **Doctor Internacional**.

Córdoba, Febrero de 2017

**Firma de los directores**



Dra. Mercedes Valera Córdoba



Dr. Luis Royo Martín



Dr. Pedro J. Azor Ortiz

Visto Bueno y Firma del Tutor y Responsable de la Línea de Investigación



Fdo: Antonio Molina Alcalá

Dra. Mercedes Valera Córdoba, Dr. Luís Royo Martín y Dr. Pedro J. Azor Ortiz

**INFORMAN:**

Que el trabajo titulado: **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA: DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS DISTINTOS ENCASTES DE LA RAZA ASÍ COMO LA CARACTERIZACIÓN DE LA ACTITUD COMPORTAMENTAL DE LA MISMA** (CHARACTERIZATION OF THE LIDIA CATTLE BREED: GENETIC DIFFERENTIATION OF DIFFERENT ENCASTES AND BEHAVIORAL ATTITUDE CHARACTERIZATION), realizado por Dña. Rocío Pelayo García bajo la dirección de la Dra. Mercedes Valera Córdoba, el Dr. Luís Royo Martín y el Dr. Pedro J. Azor Ortiz, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Firmado en Córdoba, Febrero de 2017



Dra. Mercedes Valera Córdoba



Dr. Luis Royo Martín



Dr. Pedro J. Azor Ortiz







**TÍTULO DE LA TESIS: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA: DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS DISTINTOS ENCASTES DE LA RAZA ASÍ COMO LA CARACTERIZACIÓN DE LA ACTITUD COMPORTAMENTAL DE LA MISMA.**

**DOCTORANDA: ROCIO PELAYO GARCÍA**

### **MENCIÓN DE DOCTORADO INTERNACIONAL**

Esta Tesis reúne los requisitos establecidos en el artículo 35 de Normativa de Doctorado de la Universidad de Córdoba para la obtención del título de Doctor con Mención Internacional:

- Estancia internacional predoctoral de 3 meses (24/09/2013 AL 24/12/2013) en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Davis (California) bajo la supervisión de la Dr. Cecilia Penedo.

La Tesis cuenta con el informe previo de dos doctores expertos y con experiencia investigadora acreditada perteneciente a alguna institución de educación superior o instituto de investigación de fuera de España:

- Dr. Abel Ponce de León. Research Scientist. Genomics and Molecular Genetics, University of Massachusetts.
- Dra. M<sup>a</sup> Elena Fernández. Assistan Researcher Institute of Animal Genetics “Ing. Fernando Noel Dulout”. National Research Council (CONICET). Argentina.

Parte de la Tesis se ha redactado en español e inglés y será presentada en estos dos idiomas.



”Estar preparado es importante,  
saber esperar es aún más,  
pero aprovechar el momento adecuado  
es la clave de la vida”.

*(Arthur Schnitzler)*



A mis padres, mis hermanos y a Miguel,  
por apoyar cada una de mis decisiones,  
por quererme tanto,  
por creer en mí.



## AGRADECIMIENTOS

*Al finalizar un trabajo tan apasionante, como el desarrollo de una Tesis Doctoral, te das cuenta que este trabajo habría sido imposible sin la participación de personas e instituciones que me han prestado su ayuda cada día. Por ello, para mí es un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mi agradecimiento y reconocimiento.*

*En primer lugar quiero agradecer de manera especial y sincera a los directores de esta Tesis. Mercedes Valera, Pedro J. Azor y Luís Royo. Mercedes gracias por darme esta oportunidad, por enseñarme tanto, por responder cada una de mis dudas de manera isofacta, por estar SIEMPRE ahí. Pedro, gracias por tu ayuda (sobre todo al inicio de este proyecto) y gracias por esas risas telefónicas y tantos bailes. Luís, gracias por acogerme en Asturias, por enseñarme todo lo que sé de cromosoma Y (es mi cromosoma favorito), gracias por estar presente cada día a través de Skype y por ser además de un director, UN AMIGO. Vuestro apoyo, disponibilidad y cariño, han sido fundamentales.*

*No puedo olvidarme de Antonio Molina Alcalá. Gracias por enseñarme tanto (es una suerte tener cerca una mente como la tuya), por dedicarme los minutos que no tenías, por tantos peroles organizados jajajaja. Un auténtico placer poder trabajar con jefes como tú. Muchas gracias por tu apoyo y ayudarme en todo.*

*Gracias Angelines por ser “la mami del grupo”. Siempre ayudándonos a todos, siempre con una sonrisa para todos.*

*A la Agrupación Española de Ganaderos de Reses Bravas (AEGRB). Gracias Charo por permitir que usara vuestros datos y desde mi punto de vista, creer en nuestras investigaciones. Muchas gracias Pilar y sobre todo Isabel por ayudarme a cuadrar los datos de cada informe, siempre hemos sido un buen equipo.*

*Gracias a todas las personas que me ayudaron y apoyaron cuando realicé estancias de investigación: Luis Royo en el SERIDA quien me enseñó todo lo que se del cromosoma Y pero sobre todo beber cervezas y arreglar el mundo de tarde en tarde, Cecilia Penedo (y todo su equipo) en la Universidad de Davis (California) y Simone Simone EF Guimarães (y todos los alumnos de su laboratorio) en la Universidad de Viçosa (Brasil).*

*A mi grupo de investigación MERAGEM al completo... vaya equipo divertido he tenido y vaya suerte la mía de poder tener compañeros y AMIGOS: mis niñas “Sevillanas”, Ester, María José (Rubi, cómo nos gustan las comidas de empresa y acabar durmiendo en cualquier pub jajajjjajaj), la recién llegada Julia...GRACIAS chicas porque cada una de vosotras me habéis aportado algo. Mis niños del “labo” Gabri, Membri y Sebas (en otro labo, pero compí de labo), además de compañeros sois amigos. GRACIAS por tantas risas y en especial Membri, por divertirnos dentro del departamento y fuera. GRACIAS Sebas porque sé que SERÁS MUY BUENO en mi tribunal... Mi querida “María de los Carmenes”, la mejor técnico con la que he podido trabajar, “Cristofer” (gracias por darme un abrazo cada mañana) el compañero que con mejor o peor humor jejejej, SIEMPRE soluciona cualquier problema. Carmela (mi chuchi), gracias por estar ahí (desde Genética, Producción o desde tu casa jaja), enseñarme sobre genes de carne y tener siempre una sonrisa para mí. ¡Mis AMIGAS de caballos! Marinilla, cuantas horas hemos pasado juntas:*



*ordenador con ordenador, compartiendo risas...muchas risas, después compis de piso, compartiendo series chungas y mantitas y estufilla, y después desde la distancia. Te deseo lo mejor porque creo que eres una supertrabajadora. Y mi "Sari", la pequeña, el manojito de nervios, mi compi de desayunos, mi compi de confianzas. Sigue trabajando duro y conseguirás lo que te propongas.*

*Especial mención hago de mi compi pero sobre todo AMIGA y casi hermana, Rouss. Tengo mucha suerte de poder tener amigas como tú y además poder trabajar juntas. Eres y siempre serás mi apoyo, la cabeza cuerda, la mejor persona que puedo tener al otro lado del pasillo. Muchas risas (y alguna lágrima), compartidas en estos años. No hay nada mejor que poder ir de comida de empresa con tu mejor amiga (°O°). Gracias por tu cariño, gracias por tu amistad y por tus eternos cuidados, dentro y fuera del trabajo.*

*Gracias a mis amigas (mis pollos) por estar conmigo y animarme tanto en estos años. Todas somos una, y la verdad, no sé qué haría sin cada una de vosotras.*

*El agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia (la cordobesa y la ubetense). Gracias papis, hermanos, y sobri por confiar siempre en mi trabajo y por hacerme feliz cada día.*

*Y por último, Gracias a "mi compi de viaje" por aguantar mis nervios en esta última fase, por pasar tantas horas a mi lado ayudándome y apoyándome y sencillamente, por haber aparecido en mi vida.*



**INDICE**





## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN - SUMMARY</b>	<b>25</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>3. CAPÍTULOS</b>	<b>45</b>
<b>3.1 CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES EN EL CROMOSOMA Y, DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA</b>	<b>45</b>
3.1.1 ARTÍCULO 1 (CAPÍTULO I). CONTRIBUTION OF LIDIA CATTLE BREED HISTORICAL CASTES TO THE PATERNAL GENETIC STOCK OF SPAIN.	49
3.1.2 ARTÍCULO 2 (CAPÍTULO I). IDENTIFICATION OF A NEW Y CHROMOSOME HAPLOGROUP IN SPANISH NATIVE CATTLE	63
<b>3.2 CAPÍTULO II: CALIFICACIÓN LINEAL ESTANDARIZADA PARA EL COMPORTAMIENTO EN LA RAZA DE LIDIA Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS</b>	<b>87</b>
3.2.1 ARTÍCULO 3 (CAPÍTULO II). BEHAVIOURAL LINEAR STANDARDIZED SCORING SYSTEM OF THE LIDIA CATTLE BREED BY TESTING IN HERD: ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS	89
<b>3.3 CAPÍTULO III: ESTUDIO DE POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON LA CALIDAD DE LA CARNE EN LA RAZA DE LIDIA COMO POSIBLE USO ALTERNATIVO EN EL SISTEMA DE CRÍA DE ESTA RAZA</b>	<b>101</b>
3.3.1 ARTÍCULO 4 (CAPÍTULO III). ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN CANDIDATE'S GENES FOR MEAT QUALITY IN LIDIA CATTLE	103
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>113</b>
<b>4.1 ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL TORO DE LIDIA. RELACIÓN CON OTRAS RAZAS BOVINAS</b>	<b>115</b>
<b>4.2 EL COMPORTAMIENTO ANIMAL: LA EVALUACIÓN DE LA BRAVURA EN LA RAZA DE LIDIA</b>	<b>120</b>
<b>4.3 EL TORO BRAVO DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA PRODUCCIÓN DE CARNE DE CALIDAD</b>	<b>141</b>
<b>5. CONCLUSIONES - CONCLUSIONS</b>	<b>149</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>159</b>
<b>8. LISTADO DE PUBLICACIONES</b>	<b>171</b>
8.1 PUBLICACIONES EN REVISTAS CON ÍNDICE DE IMPACTO (JCR)	171
8.2 CAPÍTULOS DE LIBRO	172
8.3 CONGRESOS INTERNACIONALES	172
8.4 CONGRESOS NACIONALES	173



# RESUMEN - SUMMARY





## 1. RESUMEN - SUMMARY

La raza bovina de Lidia recibe el nombre de su aptitud productiva (comportamiento bravo), para la que se ha requerido una selección por parte del ganadero a través de la historia de esta raza. Es una de las razas bovinas más antiguas del mundo, que abarca cerca de tres siglos de historia, durante los cuales los ganaderos de Lidia han seleccionado caracteres de comportamiento en sentido opuesto a los buscados en el resto del bovino (producción de carne y/o leche).

La actual raza de Lidia procede de cinco castas fundacionales que tienen su origen en vacadas autóctonas españolas, ya agrupadas entre los siglos XVI al XVIII, que contaban con importantes diferencias morfológicas y de comportamiento entre ellas y procedían de distintos puntos de la geografía peninsular. De acuerdo con su prototipo racial, la raza bovina de Lidia se caracteriza por una enorme diversidad genética y morfológica distribuida entre ganaderías y encastes, formados estos últimos a través de la selección realizada a partir de las castas fundacionales de procedencia, o a partir de diversos cruzamientos entre castas o encastes del mismo tronco, habiéndose extinguido en la actualidad muchos de ellos.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se centra tanto en la caracterización genética de la raza bovina de Lidia y de sus principales encastes, como en la caracterización de la actitud comportamental de la misma. Para la consecución de este objetivo el documento se ha estructurado en tres capítulos:

- Capítulo 1: “Caracterización genética a partir de marcadores moleculares en el cromosoma Y de la raza bovina de Lidia”.
- Capítulo 2: “Calificación lineal estandarizado del comportamiento en la raza de Lidia y estimación de sus parámetros genéticos”.
- Capítulo 3: “Estudio de polimorfismos asociados con la calidad de la carne en la raza de Lidia, como posible uso alternativo en el sistema de cría de esta raza”

En el primer capítulo, se aborda un análisis en profundidad sobre el cromosoma Y bovino, centrándonos en la raza de Lidia y en sus principales encastes. En el primer trabajo del capítulo tratamos de determinar si las castas fundacionales de la raza de Lidia realmente tienen un soporte genético y su origen filogenético cuando se analiza la línea paterna. Se analizaron 722



toros de Lidia pertenecientes a 28 encastes (todas las castas tuvieron representación). También incluimos para el análisis 236 animales de 16 razas Españolas, 315 individuos de 26 razas Europeas y 27 muestras de diferentes poblaciones Africanas. En total, estos 1300 machos se genotiparon para cinco microsatélites (INRA189, UMN0103, UMN0307, BM861 y BYM1) y un indel (ZFY10). Con estos marcadores identificamos 38 haplotipos (11 de ellos pertenecientes al haplogrupo Y1 y 27 al haplogrupo Y2). En la raza de Lidia encontramos 10 haplotipos de los cuales 5 fueron encontrados únicamente en esta raza, destacando la importancia que poseen algunas castas y encastes con una información genética única al estudiar la vía paterna.

El objetivo del segundo trabajo de este capítulo fue realizar un análisis exhaustivo de la diversidad genética del cromosoma Y en el ganado bovino español (centrándonos en razas locales españolas que no habían sido estudiadas previamente) entre los que se incluyeron animales pertenecientes a distintas castas y encastes de la raza de Lidia. Un total de 207 machos bovinos (*Bos taurus*) pertenecientes a 25 razas fueron genotipados para ocho marcadores del cromosoma Y. Como resultado se identificó un nuevo haplogrupo Bos Taurus, distinto a los ya descritos por otros investigadores (Y1 e Y2) y se denominó Y1.2. A continuación, se genotiparon muestras representativas de los tres haplogrupos Bos Taurus con cuatro nuevos SNPs del cromosoma Y. De los cuatro SNPs solo uno fue informativo en el Bos Taurus y ayudó a confirmar el nuevo haplogrupo Y1.2. Finalmente, se analizó una gran base de datos estandarizando los haplotipos de 1507 individuos procedentes de 57 poblaciones (de España, de otros países Europeos y África). Nuestros resultados confirmaron que el nuevo haplogrupo Y1.2 era exclusivo de las razas bovinas españolas, entre ellas, varios encastes de la casta Vistahermosa en la raza bovina de Lidia. Estos hallazgos apoyan la evidencia de la acumulación de diversidad genética en la Península Ibérica como resultado de las migraciones humanas y ganaderas de Europa Central y el cercano Oriente siguiendo rutas mediterráneas y del Norte de África así como la influencia de introgresión del Uro en el ganado doméstico. Los trabajos que integran el capítulo son:

- Pelayo R, Valera M, Molina A, Royo LJ. 2015. Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain. *Animal Genetics*, 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278.

- Pelayo R, Penedo M.C.T, Valera M, Molina A, Ginja C, Royo L.J. 2016. Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle. *Animal Genetics*. DOI: 10.1111/age.12549. In press.

En el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral se ha analizado el sistema de “Calificación Lineal Estandarizada para el Comportamiento” (CLEC) que se ha puesto a punto en la raza de Lidia, para posteriormente estimar parámetros genéticos de las variables que integran la ficha CLEC. En primer lugar, se calculó la repetibilidad (obteniendo unos valores de fiabilidad entre un 66,7% y un 97, 9%) y la reproducibilidad (85,3 % y 94,2%) de las 12 variables que componen la ficha CLEC. Posteriormente se estimaron parámetros genéticos utilizando un modelo animal con un enfoque bayesiano. Se analizaron 1202 controles de rendimiento y un pedigrí de 5001 animales. Los resultados aportaron heredabilidades (y desviaciones estándar) que oscilaron entre 0,13 (0,04) y 0,41 (0,08) para caracteres comportamentales en la raza de Lidia. Por último, se realizó un análisis de componentes principales y todas las variables de la ficha CLEC se agruparon en 3 factores que describieron los 3 índices genéticos de interés: Agresividad o bravura, fuerza y movilidad.

Por lo tanto, el uso de un sistema de calificación objetivo y estandarizado mejorará sustancialmente la correcta evaluación de los parámetros comportamentales en el ganado de Lidia. Este capítulo está integrado por 1 trabajo:

- Pelayo R, Solé M, Sánchez M.J, Molina A, Valera M. 2015. *Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133(2016): 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198.

Una estrategia interesante para mejorar la rentabilidad de las explotaciones, dada la situación de crisis por la que actualmente está pasando el sector de la ganadería brava, sería evaluar la posibilidad de mejorar las características de la carne. Esta opción conlleva ampliar los criterios de selección de la raza de Lidia buscando usos alternativos de unos animales principalmente criados en sistemas extensivos que podrían proporcionar una fuente dietética orgánica y saludable. Por ello, el objetivo del tercer capítulo de esta Tesis fue abordar un análisis de la distribución de frecuencias alélicas para una serie de polimorfismos detectados en varios genes relacionados con la calidad de la carne: CAPN1 y CAST asociados a la ternura y DGAT relacionado con la deposición grasa intramuscular de la carne.

Se analizaron 4 fragmentos de ADN en los tres genes de interés. Para ello estudiamos 119 animales de Lidia procedentes de 5 encastes diferentes (Domecq, Marqués de Albaserrada, Murube Urquijo, Núñez y Santa Coloma). Se calcularon diferentes parámetros de variabilidad genética entre las poblaciones analizadas. Como resultado, en este capítulo se presentan las frecuencias alélicas de la raza de Lidia, para los alelos previamente asociados con más ternera y mayor infiltración grasa. Aunque la asociación entre los polimorfismos y el fenotipo nunca ha sido demostrada en esta raza, la ausencia de genotipos fijos para estos polimorfismos en la población estudiada hace del ganado Lidia un buen candidato para desarrollar nuevos objetivos de selección. Este último capítulo está integrado por 1 trabajo:

- Pelayo R, Valera M, Molina A, Avilés C. 2016. *Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle*. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.

## SUMMARY

Lidia cattle breed gets its name from its productive ability (aggressive behavior), which has required a selection by the breeder throughout the history of this breed. It is one of the oldest bovine breeds in the world, covering about three centuries of history, during which the livestock breeders selected behavioral characters in the opposite direction to those sought in the rest of the cattle (meat and / or milk production).

The current Lidia cattle breed comes from five founding castes that have their origin in native Spanish herds. These herds were already grouped between the centuries XVI to XVIII, based on important morphological and behavior differences between them and coming from different points of the Iberian geography. According to its racial prototype, the Lidia breed is characterized by an enormous genetic diversity and morphology spread out between herds and *encastes*. These *encastes* have been created through selection from the original five castes into which the Lidia cattle breed is officially divided, or from several crosses between castes or *encastes* within this breed, many of them currently extinguished.

The main objective of this PhD program is focused on both the genetic characterization of the Lidia cattle breed and its main structures, as well as the characterization of its behavioral attitude. To achieve this objective the document has been structured into three chapters:

- Chapter 1: “Genetic characterization from molecular markers on the Y chromosome of the Lidia cattle breed”.
- Chapter 2: “Standardized linear classification of the behavior in the Lidia cattle breed and estimation of its genetic parameters”.
- Chapter 3: “Study of polymorphisms associated with meat quality in the Lidia cattle breed, as possible alternative use on its breeding system”.

In the first chapter, an in-depth analysis on the bovine Y chromosome is conducted, focusing on the Lidia breed and its main *encastes*. The first part of the chapter was set to determine whether the five founding castes defined in the Lidia cattle breed actually have an important contribution to the Spanish paternal genetic stock as well as to the paternal genetic origin support. 722 fighting bulls belonging to 28 *encastes* (all castes were represented) were analyzed. We also included 236 individuals from 16 Spanish breeds, 315 individuals from 26 of the remaining Europe breeds and 27 individuals from African populations. A total of 1300 *Bos Taurus* male

individuals were genotyped for five microsatellites (INRA189, UMN0103, UMN0307, BM861 and BYM1) and one indel (ZFY10). Microsatellite and indel alleles were combined into haplotypes, identifying a total of 38 haplotypes, 11 of them belonging to haplogroup Y1 and 27 to haplogroup Y2. Ten different haplotypes were found in the Lidia cattle breed, with five being exclusive to this breed, highlighting the importance of some castes and *encastes* with unique genetic information when studying the paternal lineages.

The aim of the second part of this chapter was to perform a thorough analysis of the diversity of Y-haplotypes in Spanish cattle (focusing on local Spanish breeds that had not previously been studied) among which included animals belonging to different castes and *encastes* of the Lidia breed. A total of 207 bovine males (*Bos taurus*) belonging to 25 breeds were genotyped for eight markers of the Y chromosome. As a result, a new *Bos taurus* haplogroup different from those already described by other researchers (Y1 and Y2) was identified and named as Y1.2. Samples representing the three *Bos taurus* Y-haplogroups were genotyped for four additional Y chromosome SNPs. Among these SNPs only one was informative in *Bos taurus* and 36 helped to confirm the new Y1.2. haplogroup. Finally, a large database was analyzed by standardizing the haplotypes of 1507 individuals from 57 populations (from Spain, other European countries and Africa). Our results confirmed that the new haplogroup Y1.2 was exclusive to the Spanish bovine breeds, including several Vistahermosa *encastes* within the Lidia breed. These findings further support evidence for the accumulation of genetic diversity in the Iberian Peninsula (Hewitt 2001) as a result of human and livestock migrations from Central Europe and the Near East following Mediterranean routes and from North Africa, as well as influences from aurochs introgression into the domestic stock. The papers that make up this chapter are:

- Pelayo R, Valera M, Molina A, Royo LJ. 2015. Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain. *Animal Genetics*, 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278.
- Pelayo R, Penedo M.C.T, Valera M, Molina A, Ginja C, Royo L.J 2016. Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle. *Animal Genetics*, DOI: 10.1111/age.12549. In press.

The second chapter of this PhD program has analyzed the Behavioral Linear Standardized Scoring (CLEC) system of the Lidia cattle breed that has been developed within the Lidia breed, to later estimate genetic parameters of the variables that integrate the CLEC test.

First, the repeatability (obtaining reliability values between 66.7% and 97.9%) and the reproducibility (between 85.3% and 94.2%) of the 12 variables that make up the CLEC test were calculated. Later, genetic parameters were estimated using an animal model with a Bayesian approach. A total of 1202 behavioral records were used among a pedigree matrix containing 5001 individuals. Heritability values (with standard deviations) ranged between 0.13 (0.04) and 0.41 (0.08) for behavioral characters in the Lidia breed. Finally, a principal component analysis was performed and all variables in the CLEC test were grouped into three factors that described the three genetic indexes of interest: Aggressiveness or bravery, strength and mobility.

Therefore, the use of an objective and standardized rating system will substantially improve the correct assessment of behavioral parameters in Lidia cattle. This chapter consists of 1 paper:

- Pelayo R, Solé M, Sánchez M.J, Molina A, Valera M. 2015. *Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters. Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133(2016): 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198.

Given the current crisis situation in the livestock sector, an interesting strategy to improve the profitability of farms would be to evaluate the possibility of improving the characteristics of the meat. This option entails broadening the selection criteria of the Lidia breed by looking for alternative uses of animals primarily bred in extensive systems that could provide an organic and healthy dietary source. Thus, the aim of the third chapter of this PhD program was to analyze the distribution of allele frequencies for a series of polymorphisms detected in several genes related to meat quality: CAPN1 and CAST associated with tenderness and DGAT related to intramuscular fat deposition of meat.

Four DNA fragments were analyzed among the three genes of interest. To that effect, 119 animals belonging to five different *encastes* of Lidia breed (Domecq, Marqués de Albaserrada, Murube Urquijo, Núñez y Santa Coloma) were studied, calculating different parameters of genetic variability among the populations analyzed. As a result, this chapter presents the allele frequencies of the Lydian race, for alleles previously associated with more tenderness and greater fat deposition. Although the association between polymorphisms and phenotype has never been demonstrated in this breed, the absence of fixed genotypes for these

polymorphisms in the studied population makes Lidia cattle breed a good candidate to develop new selection objectives. This last chapter is composed of one paper:

- Pelayo R, Valera M, Molina A, Avilés C. 2016. *Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle*. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.

# INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS







## 2. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

La raza bovina de Lidia recibe el nombre de la finalidad productiva que la caracteriza y para la que se requiere de una alta especialización. Es una de las razas bovinas más antiguas del mundo, ya que cuenta con un origen bien documentado, remontándose su historia a más de tres siglos. En todo el proceso de selección de esta raza los ganaderos de lidia han seleccionado caracteres de comportamiento en sentido opuesto a los buscados en el resto del bovino (selección para la producción de carne o de leche).

El ganado de Lidia constituye una raza autóctona cuya producción tiene una gran trascendencia económica y social en nuestro país ya que España es el primer país productor de ganado vacuno de Lidia. Desde el punto de vista zootécnico, se trata de un animal único en el mundo que atesora un importante caudal genético (Cañon *et al.* 2008). Por otro lado, existe un arraigo ancestral dentro de las manifestaciones culturales de muchos de nuestros pueblos y ciudades, siendo parte esencial e irremplazable en sus tradiciones festivas (Cossio 1951). Otros países donde el bovino de Lidia también tiene importancia zootécnica son Portugal, sur de Francia y diversos países de Hispanoamérica (México, Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador y Costa Rica).

El ganado se ha convertido en un importante elemento cultural, esencial en el mantenimiento de muchos estilos de vida tradicionales. Pese a que la contribución de los animales domésticos a la agricultura y al progreso económico global no ha sido adecuadamente evaluada ni apreciada, las razas autóctonas constituyen en sí mismas una fuente de valores que hacen de su conservación una necesidad prioritaria. En los últimos tiempos se está produciendo un aumento en la conciencia internacional del papel esencial que juegan en la producción y la productividad de la agricultura los recursos genéticos animales y un consiguiente aumento en la cantidad de estudios sobre diversidad genética en animales domésticos (Amos & Balmford 2001; Barker 2001; Baumung *et al.* 2004; Bennewitz & Meuwissen 2005; Ollivier *et al.* 2005). En este sentido, el ganado de Lidia es considerado el máximo exponente de la cría extensiva, por sus particularidades etológicas, la necesidad de amplios espacios y la dificultad en el manejo que presenta (Purroy 2003). La mayoría de las ganaderías se enmarcan en territorios adhesados jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la biodiversidad. Muchas

de ellas están ubicadas en parques naturales y algunas en parques nacionales, donde contribuyen a la conservación del ecosistema (García 2011).

La raza de Lidia se genera en España en la Edad Media. En esta época los señores feudales mantenían toros, como otros animales salvajes, en cautividad, sin una selección especial. En tiempos de los Reyes Católicos ya se dan los primeros indicios de selección del toro bravo, durante los siglos XV y XVI, en la provincia de Valladolid se cría, en amplios terrenos, una vacada que pudo sentar las bases de la bravura del toro de lidia actual (Cossio 1951). El animal se caracteriza por su agresividad y resistencia al manejo convencional (Rodríguez 2002). Ha ido evolucionando a lo largo de los siglos mediante una selección orientada hacia la potenciación de un carácter psicológico denominado bravura, de acuerdo con unos modos o modas y en medios de ecología diversa, conformándose animales de morfología variada y de dotaciones génicas ampliamente alejadas entre sí (Sotillo *et al.* 1996).

La primera reseña de un festejo taurino aparece en el año 815 en el reino de León. A partir de este momento, los animales destinados a la lidia son elegidos con criterios opuestos a los de la domesticación convencional; se extraen de las “piaras” de bovino los machos más broncos, rebeldes a las formas de manejo de cada época, refractarios a la doma y al yugo, desahuciados para las labores agrícolas, aunque todavía no se reproducen, sino que simplemente se separan del grupo para ser juzgados en espectáculos taurinos (García-Martínez 2008).

Hasta el siglo XVI, son los carniceros quienes proporcionan toros para la lidia extraídos del vacuno de la tierra. A partir del siglo XVII, y sobre todo durante el siglo XVIII, se produce en España una verdadera especialización productiva en ganaderías de lidia, que no sólo seleccionan este tipo de animales a partir de sus vacadas, sino que además se dedican a la reproducción de los mismos. En la cría del ganado bravo se tienen en cuenta las características individuales de los futuros reproductores, la ascendencia y descendencia para escoger los sementales, y la descendencia para seleccionar vacas. Este sistema de selección, de absoluta vigencia en la actualidad, constituyó en su tiempo una auténtica innovación (García-Martínez 2008). Lo que actualmente conocemos como “corrida de toros” surge, según D. José Ortega y Gasset, en torno a 1728 tras un largo proceso evolutivo. Los ganaderos orientan su selección a partir de este momento, y hasta nuestros días hacia este tipo de festejo. Se podría decir que en nada se asemeja el toro actual al de hace varios siglos.

En el siglo XVIII se popularizan las corridas de toros, hecho que coincide por una parte con la construcción de las primeras plazas de toros en las principales ciudades españolas, y por otra parte con la creación de las primeras tauromaquias de este espectáculo, que fijan la técnica y las normas y definen el arte de torear. En épocas anteriores se extraían para la lidia reses de ciertos rebaños que producían indistintamente carne, labor o lidia. En este siglo nacen las primeras ganaderías que seleccionan y crían el toro con un único objetivo de producción: la lidia, y una producción secundaria, la carne de los animales lidiados.

El antepasado más remoto del toro de lidia, al igual que el de la mayoría de los bovinos actuales, es el Uro (*Bos primigenius*), una especie de rumiante salvaje que los celtas llamaron “auroch” (de *aur*, salvaje; y *och*, toro) (Payne 1970). En la actualidad se reconocen tres subespecies de *Bos primigenius* según su localización geográfica: *Bos primigenius primigenius* en el noroeste de Eurasia, *Bos primigenius namadicus* en el sureste de Asia y *Bos primigenius opisthonomus* en África (Payne 1970; Epstein & Mason 1984), que son los antecesores de las razas bovinas actuales.

Del Uro proceden todas las razas de toros bravos, lo que justifica la gran semejanza existente en un buen número de bovinos que se encuentran en diversas regiones europeas, en estado semisalvaje. Cortés (2008) argumenta que el Uro, ancestro salvaje de los bóvidos actuales, sufrió varios procesos de domesticación en diferentes momentos y regiones del mundo que comenzaron hace unos 10.000 años. Mientras que en el subcontinente indio el bovino doméstico que aparece pertenece a la subespecie *Bos taurus indicus*, tipo cebuino, bovinos con joroba, en Europa el tipo de bovino doméstico que aparece es el perteneciente a la subespecie *Bos taurus taurus*, tipo taurino, bóvidos sin joroba. Análisis realizados en razas bovinas de África, Europa y Asia evidenciaron una clara separación entre los taurinos y cebuinos, proporcionando mayor veracidad a la teoría del doble origen de la domesticación (MacHugh *et al.* 1997). A partir de la domesticación, los movimientos humanos fueron acompañados de movimientos de los animales, influyendo estos procesos migratorios en la actual distribución de las razas bovinas.

Los análisis de ADN mitocondrial (Anderung *et al.* 2005; Beja-Pereira *et al.* 2006) muestran evidencias de que los ancestros de los bovinos africanos y europeos se habrían separado hace unos 25.000 años por lo que se habría producido antes del proceso de domesticación. Estudios con secuencias de ADN del cromosoma Y tomadas de numerosos ejemplares de toros salvajes

y diferentes razas domésticas Cortés (2008), llegaron a la conclusión de que al menos, en las razas bovinas del Norte de Europa ha habido una masiva hibridación con toros salvajes.

La situación geográfica de la Península Ibérica, entre Europa y África, ha favorecido la influencia de poblaciones bovinas llegadas de ambos continentes. Durante este proceso de expansión e influido por diferentes hechos, como los más que probables cruces entre el ganado doméstico y el salvaje de la zona, la adaptación a distintos medios, la fragmentación de la población y el consiguiente aislamiento reproductivo o la finalidad de su cría, se fueron perfilando las actuales razas bovinas a partir de un mismo origen.

Como ya se ha indicado, la raza bovina de Lidia se ha distribuido en muchos países de todo el mundo, desde Europa (Francia, España y Portugal) hasta los países del Norte, Centro y Sur de América (Silva *et al.* 2006). Los estudios genéticos han indicado que los animales de esta raza poseen un pul genético ancestral y una cantidad inusual de DNA procedente de bovino africano, tal vez del Magreb, y que data de la época de ocupación árabe de España (Cortés *et al.* 2008). El análisis de marcadores moleculares localizados tanto en el ADN mitocondrial como en el cromosoma Y revela las influencias maternas y paternas que ha tenido una raza o población y las frecuencias de los diferentes haplotipos permite analizar las diferencias con otras poblaciones o entre las subpoblaciones. Por lo tanto, diferentes estudios con ADN mitocondrial han permitido confirmar las evidencias mostradas por los restos arqueológicos en el origen y evolución del género *Bos* y particularmente de dos de sus ramas, los cebuinos (*Bos indicus*) y taurinos (*Bos taurus*) fechando su bifurcación hace unos 100.000 años y su domesticación independiente hace 10.000 años, en Oriente Próximo los taurinos y en el sureste de Pakistán los cebuinos (Loftus *et al.* 1994; Bradley *et al.* 1996; Troy *et al.* 2001).

Desde que ha sido factible el análisis de nuestro material genético con nuevas técnicas, el estudio del cromosoma Y, por sus especiales características, está despertando grandes expectativas al revelarse como una útil fuente de polimorfismos de ADN. Durante mucho tiempo el cromosoma Y se consideró como un cromosoma que no contenía información genética a excepción del gen SRY o de determinación del sexo. La mayor parte de su secuencia parecía no tener sentido y estaba plagado del denominado ADN basura o *Junk DNA* por lo que se creía que este cromosoma era un vertedero de ADN. Sin embargo trabajos recientes en humanos (Jobling & Tyler-Smith 2003; Skaletsky *et al.* 2003) han demostrado que en la región específica masculina del cromosoma Y (MSY) están presentes más de 20 genes o familias de genes.

Debido al desconocimiento de la secuencia de este cromosoma, el proceso de localización de genes en el cromosoma Y bovino todavía se encuentra en desarrollo. El estudio del cromosoma Y presenta grandes dificultades debido a características específicas como la presencia de secuencias repetitivas y la falta de recombinación con el cromosoma X. Pese a ello, el análisis del cromosoma Y sigue siendo la fuente de información que permite conocer la historia de las líneas paternas en las especies mamíferas.

Dentro de la raza de Lidia, hay reconocidos varias castas y encastes (BOE 2001). Las ganaderías de Lidia dedicadas a la cría del toro bravo tal como hoy las conocemos, se han ido formando en el tiempo a partir de cinco agrupaciones llamadas “Castas Fundacionales” que tienen su origen en vacadas autóctonas españolas, ya agrupadas entre los siglos XVI al XVIII, que contaban con importantes diferencias morfológicas y de comportamiento entre ellas y procedían de distintos puntos de la geografía peninsular, en su mayoría humedales o zonas de difícil acceso que pudieron servir de refugio a los últimos bovinos salvajes peninsulares (BOE 2001).

Al hablar de “Castas Fundacionales”, nos referimos a las poblaciones de bovinos de las cuales se extraían toros de Lidia, constituidas en ganaderías especializadas en la producción y reproducción de reses de Lidia, que han tenido o podido tener continuidad hasta nuestros días, aunque actualmente, como consecuencia fundamentalmente de diversos cruzamientos u otros procesos evolutivos, puedan aparecer más o menos difusas (Cañón *et al.* 2008). Las castas fundacionales fueron la Navarra, Gallardo, Vazqueña, Cabrera y Vistahermosa. Los animales derivados de cada una de estas Castas y encastes responden a unos prototipos morfológicos y de comportamiento considerablemente definidos, fijados y difundidos en el conjunto de la cabaña brava y que permiten diferenciar a los individuos pertenecientes a cada una de ellas (Cañón 2011). En los tiempos modernos, la casta predominante es la de Vistahermosa con sus múltiples ramas, constituyendo la base fundamental de la raza de Lidia, cuyas características se consideran los más adecuadas para los estilos requeridos en las actuales corridas de toros. De ella derivan trece encastes en pureza y otros tres por relación de cruces (Rodríguez 2002). La distancia genética entre encastes es, por término medio, casi tres veces mayor que la existente entre cualquier pareja de razas de ganado bovino europeo. La de Lidia podría ser considerada como una raza de razas, con una gran diversidad genética (Cañón *et al.* 2008).

Los toros actuales muestran caracteres procedentes de los mencionados encastes en un

mosaico de gran variabilidad, aunque algunos de ellos han desaparecido totalmente y otras han sufrido muchas modificaciones, hecho que hace difícil reconocer biotipológicamente su influencia en las ganaderías actuales (Fernández 2008).

En el año 2011 se aprueba por parte de MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino) un Programa de Mejora Genética conjunto para las cinco Asociaciones de Ganaderos reconocidas dentro de esta raza (Unión de Criadores de Toros de Lidia, Asociación de Ganaderías de Lidia, Agrupación Española de Ganaderos de Reses Bravas, Ganaderos de Lidia Unidos y Asociación de Ganaderos de Reses de Lidia): Programa de Mejora de la Raza Bovina de Lidia. En el marco de la mejora genética, podemos distinguir tres actividades principales desarrolladas hasta ahora por las distintas asociaciones oficialmente reconocidas para la gestión del Libro Genealógico, con distinto énfasis en cada una de ellas: organización de las ganaderías alrededor de los actuales encastes, planificación de apareamientos para minimizar el incremento en endogamia y estimación del mérito genético de toros y vacas para un conjunto de caracteres de comportamiento relacionados con la lidia (bravura, fuerza, fijeza y movilidad).

Las ganaderías que participen en este Programa de Mejora Genética, desarrollarán diferentes estrategias genéticas que requieren, además de la información genealógica, los resultados de las pruebas funcionales, para desarrollar programas de selección y/o de conservación en función principalmente del número de animales que puedan verse implicados, lo que supone analizar las conexiones entre las ganaderías, clasificar a los animales según su origen y clasificar a los encastes por censo efectivo. Por todo ello, el objetivo principal de este programa será proporcionar una información precisa del valor genético de los reproductores disponibles para que los ganaderos puedan llevar a cabo los apareamientos dirigidos que le puedan proporcionar un mayor beneficio, es decir, buscar los genes o combinación de genes que maximicen la producción, con base en la selección y el cruzamiento.

Esta Tesis Doctoral se estructura en tres capítulos, conectados entre sí, que abordan distintos aspectos del Programa de Mejora de la raza de Lidia. Cada uno de estos capítulos está integrado por artículos científicos JCR en los que se encuentran publicados los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis.

## OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral es la caracterización genética de la raza bovina de Lidia desde el punto de vista de la diferenciación genética de los encastes que integran la raza y la caracterización de la actitud comportamental en la misma.

Este objetivo general se estructura en varios **objetivos específicos**:

1. Determinar si las castas originarias del bovino de Lidia y los encastes en los que han derivado tienen un soporte genético y determinar su origen filogenético, al estudiar la vía paterna. Este objetivo se ha abordado en el ARTÍCULO 1 DEL CAPÍTULO I.
2. Realizar un análisis exhaustivo de la diversidad haplotípica del cromosoma Y en el ganado bovino español y en el vacuno de Lidia en particular. Para ello nos centraremos en las poblaciones bovinas locales españolas que no se habían sido estudiadas en trabajos anteriores y que se localizan en regiones donde el ganado tenía altos niveles de diversidad genética; y en segundo lugar se usará marcadores adicionales y específicos del cromosoma Y. Este objetivo se ha abordado en el ARTÍCULO 2 DEL CAPÍTULO I.
3. Validar en la raza de Lidia un sistema de calificación lineal estandarizado para el comportamiento (ficha CLEC), que permita realizar la evaluación de las principales características comportamentales relacionadas con la lidia durante la faena de "tienta" para la selección de los futuros reproductores en las ganaderías. Este objetivo se ha abordado en el ARTÍCULO 3 DEL CAPÍTULO II.
4. Estimar los parámetros genéticos (heredabilidad y correlaciones genéticas) de las principales variables comportamentales evaluadas con el empleo de la ficha CLEC durante la fase de "tienta" de reproductores en las ganaderías. Este objetivo se ha abordado en el ARTÍCULO 3 DEL CAPÍTULO II.
5. Analizar, en los principales encastes de la raza bovina de Lidia, la segregación de varios polimorfismos en tres genes (CAPN1, CAST y DGAT1) relacionados con la calidad de la carne, con el fin de ver su uso como animal de producción de carne de calidad. Este objetivo se ha abordado en el ARTÍCULO 4 DEL CAPÍTULO III.



Por lo tanto, la **Hipótesis** que se pretende contrastar en la presente Tesis es comprobar, a partir de los marcadores moleculares, que en primer lugar, en la raza bovina de Lidia las castas y encastes en las que se estructura poseen un perfil genético diferenciado que las constituye como poblaciones genéticamente singulares y que por consiguiente hay que tener en cuenta en un programa de conservación de la raza, y en segundo lugar, demostrar que esta raza posee desde el punto de vista genético un buen potencial para producir carne de calidad. Así mismo, corroborar que los caracteres comportamentales relacionados con la bravura tienen una base genética que permitirá realizar una selección de reproductores y una mejora genética de esta raza.

# CAPÍTULOS





### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1 CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES EN EL CROMOSOMA Y, DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA

Este primer capítulo está constituido por dos artículos científicos:

- Pelayo R, Valera M, Molina A, Royo L.J 2015. *Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain*. Animal Genetics, 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278.
- Pelayo R, Penedo M.C.T, Valera M, Molina A, Ginja C, Royo L.J 2016. *Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle*. Animal Genetics, (accepted)

#### RESUMEN

El primer capítulo de la presente Tesis Doctoral presenta un análisis en profundidad sobre el cromosoma Y bovino en la raza de Lidia y sus principales encastes.

Diferentes estudios evidencian la acumulación de diversidad genética en la Península Ibérica como resultado de las migraciones humanas y ganaderas de Europa Central y el cercano Oriente siguiendo rutas mediterráneas y del Norte de África, así como la influencia de introgresión del Uro en el ganado doméstico. Con esta información, el principal objetivo del primer artículo fue analizar la vía paterna de la raza de bovina de Lidia teniendo en cuenta sus cinco castas fundacionales (Cabrera, Gallardo, Navarra, Vazqueña y Vistahermosa), para comprobar si realmente tienen un soporte genético y cuál es el origen filogenético cuando se analiza la línea masculina. Como segundo objetivo se trató de aclarar si la raza de Lidia posee linajes paternos únicos que pudieran contribuir a la diversidad genética ibérica de la antigüedad.

Se genotiparon 1300 individuos (*Bos Taurus* machos) para cinco microsatélites (INRA189, UMN0103, UMN0307, BM861 y BYM1) y un indel (ZFY10) del cromosoma Y bovino. Se identificaron un total de 38 haplotipos, 11 de ellos pertenecientes al haplogrupo Y1 y 27 al haplogrupo Y2. En los animales de Lidia se obtuvieron 10 haplotipos de los cuales 5, fueron

exclusivos de esta raza. Nuestros resultados identificaron a la raza de Lidia como algo más que una simple raza, es decir, como un agrupamiento racial de diferentes poblaciones y orígenes, debiéndose la mayor parte de la variabilidad genética de esta raza a las castas y encastes en los que se encuentra estructurada la misma. En este mismo estudio también se comprobó que al analizar la vía paterna, algunas castas y encastes poseían una información genética única (es decir, haplotipos exclusivos no encontrados en ninguna otra raza), como por ejemplo las castas Gallardo, Cabrera y Navarra y algunos encastes de la casta Vistahermosa (encaste Contreras entre otros). Por lo tanto, en términos de conservación, sería mejor no considerar esta raza como una unidad, sino considerar la casta o mejor aún el encaste, como el objetivo de los esfuerzos de conservación.

En el segundo trabajo de este capítulo se ha realizado un análisis exhaustivo de la diversidad genética del cromosoma Y en el ganado bovino español, prestando especial atención a las poblaciones bovinas locales españolas que no habían sido estudiadas previamente en otros trabajos relacionados con el cromosoma Y. Así mismo, la raza de Lidia también fue analizada en este trabajo, teniendo en cuenta sus principales encastes. Como novedad, se investigaron cuatro SNPs específicos del cromosoma Y (entre otros marcadores) que tampoco habían sido examinados hasta el momento (rs121919254, rs121 919281, rs121919323, rs137049553).

Un total de 207 machos *Bos taurus* pertenecientes a 25 razas Europeas (15 de ellas son razas Españolas clasificadas por regiones geográficas y dentro de estas, la raza de Lidia dividida por encastes) fueron genotipados para ocho marcadores del cromosoma Y (BM861, BYM1, INRA189, UMN0103, UMN0307, ZFY10, UTY19 y USP9Y). Como resultado se identificó un nuevo haplogrupo *Bos Taurus*, distinto a los ya descritos por otros investigadores (Y1 e Y2) y se denominó Y1.2. La raza Tudanca en la región del Norte de España, la raza Avileña y la casta Vistahermosa de Lidia en el centro, y las razas Berrenda Colorada y Negra, Pajuna, Retinta y de nuevo la casta Vistahermosa en la región del sur de España, integraron este nuevo haplogrupo.

A continuación, se genotiparon muestras representativas de los tres haplogrupos *Bos Taurus* con cuatro nuevos SNPs del cromosoma Y (rs121919254, rs121919281, rs121919323, rs137049553). De los cuatro SNPs solo uno fue informativo en el *Bos Taurus* (rs121919281) y ayudó a confirmar el nuevo haplogrupo Y1.2.

Finalmente, se analizó una gran base de datos estandarizando los haplotipos de 1507 individuos procedentes de 57 poblaciones (de España, de otros países europeos y de África). Nuestros resultados confirmaron que el nuevo haplogrupo Y1.2 era exclusivo de las razas españolas (entre ellas, diferentes ganaderías de la casta Vistahermosa de la raza bovina de Lidia). Este hallazgo refuerza la importancia del ganado local español como reservorio de la diversidad genética, así como la importancia de la Península Ibérica en la historia del ganado bovino.



**3.1.1 ARTÍCULO 1 (CAPÍTULO I). CONTRIBUTION OF LIDIA CATTLE BREED HISTORICAL CASTES TO THE PATERNAL GENETIC STOCK OF SPAIN.**

Título (en Español): **CONTRIBUCIÓN DE LAS HISTÓRICAS CASTAS DE LA RAZA BOVINA DE LIDIA AL PATRIMONIO GENÉTICO PATERNO ESPAÑOL.**

Authors: **Pelayo R<sup>1</sup>**, Valera M<sup>1</sup>, Molina A<sup>2</sup>. and Royo L.J<sup>3</sup>

Affiliations: <sup>1</sup>Departamento de Ciencias Agro-Forestales, ETSIA, Universidad de Sevilla, Ctra. Utrera km 1, 41013-Sevilla, España; <sup>2</sup>Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, UCO, Ctra. Madrid-Cádiz (N-IV) Km.396<sup>a</sup>, 14071-Córdoba, España; <sup>3</sup>Área de Nutrición, Pastos y Forrajes, SERIDA, Villaviciosa, Asturias, España.

Publication: **Animal Genetics, 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278**

- Impact Index: 1,779 (Journal Citation Report, 2015).
- Subject and Quartile: Genetics and heredity, 1st quartile.







## Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain

R. Pelayo\*, M. Valera\*, A. Molina<sup>†</sup> and L. J. Royo<sup>‡</sup>

\*Department of Agroforestry Science, University of Seville, Seville, Spain. <sup>†</sup>Department of Genetics, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

<sup>‡</sup>Área de Nutrición, Pastos y Forrajes, SERIDA, Villaviciosa, Asturias, Spain.

### Summary

The main objective of this work was to determine whether the five founding castes defined in the Lidia cattle breed actually have an important contribution to the Spanish paternal genetic stock as well as to the paternal genetic origin support. A total of 1300 *Bos taurus* male individuals were genotyped for five microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*, *UMN0307*, *BM861* and *BYM1*) and one indel (*ZFY10*). Microsatellite and indel alleles were combined into haplotypes, identifying a total of 38 haplotypes, 11 of them belonging to haplogroup Y1 and 27 to haplogroup Y2. Ten different haplotypes were found in the Lidia cattle breed, with five being exclusive to this breed. Our results agree with different male genetic stocks in the Lidia breed: one hypothetically representing the ancient Iberian bovine genetic stock (Gallardo, Navarra and Cabrera castes and some *encastes* from Vistahermosa) and a second one that is the result of the more recent breeding strategy of choosing the most aggressive individuals from traditional herds (including some Vistahermosa *encastes* and the Vazqueña caste). In terms of conservation, it would be better to not consider this breed as a unit but to consider the caste, or even better the *encaste*, as the target of putative conservation efforts.

**Keywords** Bovine, paternal phylogeny, Y-chromosome

The Lidia cattle breed originated in Spain during the Middle Ages and is characterized mainly by its rusticity and behavior. Its breeding system is completely extensive, which has an important effect on landscape conservation. Many factors have promoted a wide diversity in the breed, for example, the various traditional shows that require different bull behavior and characteristics. In turn, this has led to the population fragmenting into subpopulations, traditionally called '*encastes*' with different levels of gene flow among them (Cañón *et al.* 2008). These *encastes* are assumed to have been created through selection to form the original five castes into which the Lidia cattle breed is officially divided (Boletín Oficial del Estado 2001).

Previous studies on the structure of the population within the Lidia breed using microsatellite markers revealed that the level of differentiation between herds was very large (Cañón *et al.* 2008), even higher than that found among some European cattle breeds (MacHugh *et al.* 1998). Two main maternal influences were found in the Lidia breed:

European (haplotype *T3*) as the most common and African (*T1* haplotype), which agrees with other Mediterranean breeds (Cortés *et al.* 2008) studied so far. Other researchers also have studied the paternal genetic variability of the Lidia cattle breed (Ginja *et al.* 2009; Pérez-Pardal *et al.* 2010; Cortés *et al.* 2011). These researchers analyzed the Lidia breed as just a single breed without taking into account the breed subdivision into castes, and they showed that in general, the Lidia cattle breed is currently similar to any other breed in the Iberian Peninsula, with a high proportion of Y2 haplotypes and a low frequency of Y1. However, these previous findings did not reflect the history or the actual importance of the castes in the Spanish paternal genetic stock.

In this work, we tried to address whether the original castes have genetic support and what the phylogenetic origin is when analyzed on the male line. In addition, we also tried to clarify whether the Lidia cattle breed has unique paternal lineages that might represent ancient Iberian genetic stock. To achieve this, we first compared the Y-chromosome haplotypes found in samples of all five Lidia cattle breed ancestral castes in Spain and then compared the *B. taurus* Y-chromosome with all the available information from the Iberian Peninsula and the rest of the world.

Address for correspondence

R. Pelayo, Department of Agroforestry Science, University of Seville, Crta. Utrera, Km 1, 41013 Seville, Spain.  
E-mail: v22pegar@uco.es

Accepted for publication 18 January 2015

Genotypes from Pérez-Pardal *et al.* (2010) (*B. taurus* males belonging to 45 cattle populations from Europe and Africa) and Cortés *et al.* (2011) (males belonging to Lidia cattle breed) were complemented with 92 samples, randomly selected within breed or caste, belonging to 57 males from the Lidia cattle breed from 10 different *encastes* plus 35 males from geographically related Spanish breeds (Cárdena Andalusian, Berrenda Colorada, Berrenda Negra and Retinta).

Based on its herd of origin, every individual from the Lidia cattle breed was assigned to its *encaste*, each belonging to one of the five ancestral castes or the two allowed crosses. A total of 1300 *B. taurus* males were available for this study, of which 722 were from Lidia males representing 28 *encastes* belonging to seven castes: the five original castes, one Vistahermosa mixed group (from crosses of Vistahermosa) officially designated as a different caste and another mixed group (crosses between other castes) as described in Boletín Oficial del Estado (2001) (Table S1). We also included 236 individuals from 16 Spanish breeds, 315 individuals from 26 of the remaining European breeds and 27 individuals from African populations.

After meticulous genotype standardization, microsatellite (INRA189, UMN0103, UMN0307, BM861, BYM1) and the ZFY10 indel alleles were combined into haplotypes (Table S2). A median-joining network connecting different haplotypes was constructed using NETWORK 4.5.2 (Bandelt *et al.* 1999). To avoid reticulation, a reduced median algorithm (Bandelt *et al.* 1995) was used to generate an rmf file before applying the median-joining network method (Bandelt *et al.* 1999) to this file.

ARLEQUIN v3.11 (Excoffier *et al.* 2005) was used to determine haplotype frequency for each population (*encaste*), pairwise  $F_{ST}$  values with 1000 permutations and significance at  $P = 0.05$ . This program was also used to analyze allele frequencies and molecular variance (AMOVA). This AMOVA analysis was restricted to individuals belonging to the Lidia cattle breed, excluding castes originating from crosses, and was carried out by fitting two hierarchical levels: caste and *encaste* within caste.

A total of 38 haplotypes were identified. Following nomenclature by Götherström *et al.* (2005), 11 of them belonged to haplogroup Y1 (25.5%) and 27 to haplogroup Y2 (74.5%). Haplogroups did not share haplotypes. Haplotype distribution and frequency per breed are shown in Table S3. The most common Y1 haplotypes were Y1H4 and Y1H11, with Y1H4 being the most frequent in European breeds. Likewise, Y2H17 was the most common Y2 haplotype, found in all the sampling areas, and was fixed in one Spanish breed and in eight European breeds.

In Spain, 958 individuals were sampled, with 722 belonging to the Lidia cattle breed. There were five different Y1 haplotypes, representing 20% of the sample. In the case of the Y2 group, 11 haplotypes were found, with 80% of the total individuals. The most frequent Y1 haplotype was

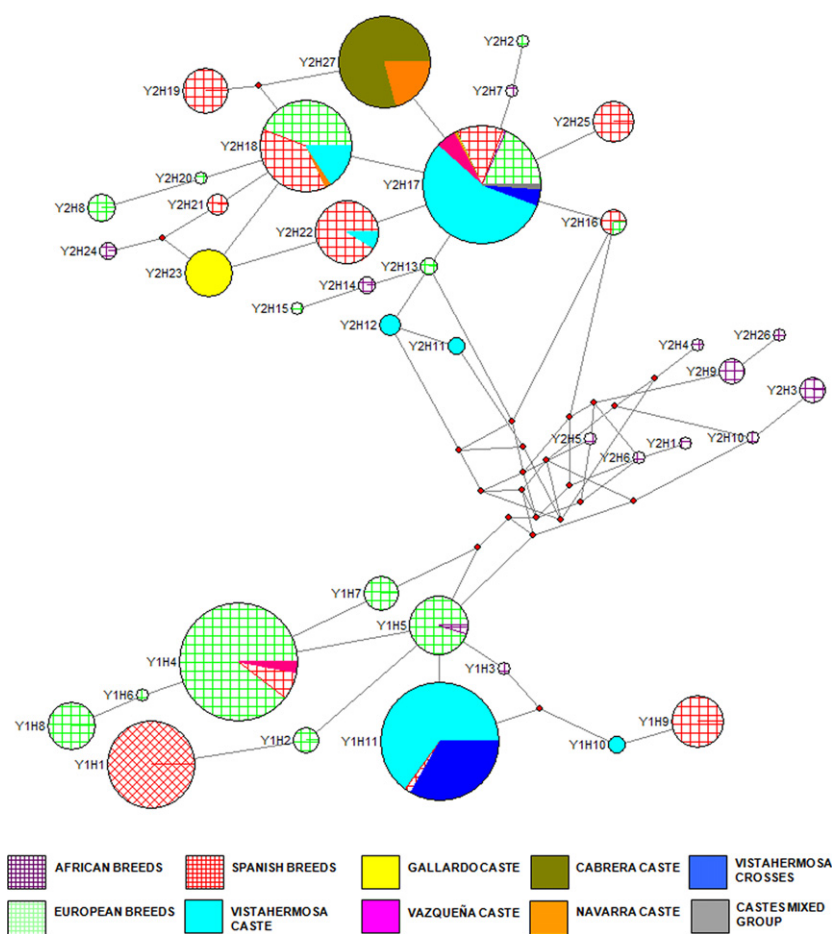
Y1H11 (12.2%), and Y2H17 was the most frequent Y2 haplotype (64.9%).

The relationships among Y-chromosome haplotypes are shown in a median-joining network (Fig. 1). Two distinct clusters were established corresponding to Y1 and Y2 haplogroups, with some haplotypes located in an intermediate position, confirming the African subfamily previously described (Pérez-Pardal *et al.* 2010). Eleven European breeds, nine Spanish breeds and two Lidia castes were included in the Y1 cluster. The Y1H4 haplotype was shared by the European breeds and the breeds from Spain (but with low frequencies) including three individuals from the Vazqueña caste. The Vistahermosa caste and its crosses were also grouped into two haplotypes within the Y1 cluster (Y1H10 and Y1H11). The Y2 cluster comprised 21 European breeds, 16 Spanish breeds and all Lidia castes. Most breeds shared haplotypes except for Y2H23 and Y2H27, which were specific to the Lidia cattle breed. Y2H11 and Y2H12 haplotypes also were specific to the Lidia breed but had very low frequencies.

The average  $F_{ST}$  values, shown in Table S3, ranged from 0.32 to 0.33 in Parthenais and Croatian Simmental to 0.88–0.89 in Tudanca and Angus. Within the Lidia breed, we found some castes with a low average  $F_{ST}$  value, such as the Vistahermosa (0.29), and some with a high average  $F_{ST}$  value, such as the Gallardo (0.88). The AMOVA analysis (Table S4) showed that almost half of the genetic variation in the Lidia breed Y-chromosome (49.19%) was due to differences among castes and that the difference among individuals (20.94%) was less important than among *encastes* (29.87%).

A special effort was made to cover as much variability as possible in the Lidia breed by analyzing samples from the original five castes and the most important *encastes* they are divided into. Among the 10 haplotypes identified in the Lidia breed (three Y1 and seven Y2 haplotypes), five were exclusive to the Lidia breed (Y1H10, Y2H11, Y2H12, Y2H23 and Y2H27) and five were shared with other Spanish breeds (Y1H4, Y1H11, Y2H17, Y2H18 and Y2H22). A more detailed analysis of genetic variability focusing on castes showed that some of these castes had exclusive haplotypes, as in the case of the Vistahermosa (Y1H10, Y2H11 and Y2H12) and the Gallardo (Y2H23) castes. The Cabrera and Navarra castes shared an exclusive Lidia haplotype (Y2H27). Exclusive haplotypes were present in singular *encastes* within castes (in the Vistahermosa caste: Contreras, Y1H10; Domecq, Y2H11; and Murube-Urquijo, Y2H12) but not in other *encastes* of the same caste.

Our study provides evidence that castes, or at least some of them, originated from different backgrounds, considering at least four different male stocks. Three of these are exclusive to the Lidia cattle breed and could be considered as a part of the genetic stock of wild bovines that settled in the Iberian Peninsula: the first one present in the Gallardo



**Figure 1** Network constructed using Y-chromosome haplotype data from 1300 animals. Circle sizes are proportional to haplotype frequency.

caste, the second represented by the Navarra-Cabrera caste (both considered to be endangered) and the third present in some Vistahermosa singular *encaste*. The last source of genetic variability is haplotypes that are shared with some other Iberian breeds, which corroborate the trend at the beginning of the 18th century to take the most aggressive males from different established populations. This male genetic stock is represented by Vazqueña and by some *encastes* of the Vistahermosa castes.

Modern cattle show a geographical pattern of Y-chromosome haplotype distribution across Europe, with the Y1 haplogroup more frequent in the north and the Y2 in southern and central Europe. Some authors have argued that such a pattern is just due to modern practices of cattle keeping (Svensson & Götherström 2008) rather than to historical events. Although this is not within the scope of this work, the presence of some Y1 haplotypes exclusively constituted by Spanish cattle from the South (Berrenda Negro, Berrenda Colorado, Cárdena, Vistahermosa) and the North (Asturiana de los Valles, Asturiana de la Montaña, Tudanca) (Y1H1, Y1H9, Y1H10 and Y1H11; Fig. 1) suggests that the Y1 haplogroup is more widely distributed than previously assumed. Furthermore, in a previous study,

a putative paternal African subfamily was found (Pérez-Pardal *et al.* 2010), showing five and 12 Y-chromosome exclusive alleles and haplotypes respectively. Also, in Spain, five and 12 exclusive Y-chromosome alleles and haplotypes respectively were found, highlighting the putative importance of Spain in the history of the species (Table S5).

Our results identify the Lidia breed as more than a simple breed; it seems more a racial grouping of different populations and origins. AMOVA analysis shows that most of the genetic variability is due to divisions within castes and that a good percentage is due to *encastes* within castes, with only 20.94% variability between individuals of the same *encaste*. The special breeding goals and breeding system of the Lidia cattle, as well as the diverse origin of its five founding castes, have defined the genetic variability of this breed. In terms of conservation, it would be better not to consider this breed as a unit but to consider the caste, or even better the *encaste*, as the target of putative conservation efforts. Throughout the study, some castes or *encastes* were highlighted as singular, such as the Gallardo, Navarra and Cabrera castes and the Contreras, Domecq and Murube-Urquijo *encastes*, whereas other *encastes* seem to comprise a sampling from other neighboring populations.

## Acknowledgements

We acknowledge the collaboration of the Lidia Cattle Breed Association (Agrupación Española de Ganaderos de Reses Bravas). Rocio Pelayo was partially funded by grant MHE2011-00117 (Spanish Ministry of Education, Culture and Sports).

## References

- Bandelt H.-J., Forster P., Sykes B.C. & Richards M.B. (1995) Mitochondrial portraits of human populations. *Genetics* **141**, 743–53.
- Bandelt H.-J., Forster P. & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37–48.
- Cañón J., Tupac-Yupanqui I., García-Atance M.A., Cortés O., García D., Fernández J. & Dunner S. (2008) Genetic variation within the Lidia bovine breed. *Animal Genetics* **39**, 439–45.
- Cortés O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., García-Atance M.A., García D., Fernández J. & Cañón J. (2008) Ancestral matrilineages and mitochondrial DNA diversity of the Lidia cattle breed. *Animal Genetics* **39**, 649–54.
- Cortés O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., Fernández J. & Cañón J. (2011) Y chromosome genetic diversity in the Lidia bovine breed: a highly fragmented population. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **128**, 491–6.
- Boletín Oficial del Estado (2001) Real Decreto 60/2001, de 26 de Enero, sobre prototipo racial de la raza bovina de Lidia. *Boletín Oficial del Estado* **38**, 5255–61.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005) ARLEQUIN version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47–50.
- Ginja C., Telo da Gama L. & Penedo M.C. (2009) Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs. *Journal of Heredity* **100**, 148–57.
- Götherström A., Anderung C., Hellborg L., Elburg R., Smith C., Bradley D.G. & Ellegren H. (2005) Cattle domestication in the near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proceedings of the Royal Society B* **272**, 2345–50.
- MacHugh D.E., Loftus R.T., Cunningham P. & Bradley D.G. (1998) Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* **29**, 333–40.
- Pérez-Pardal L., Royo L.J., Beja-Pereira A. *et al.* (2010) Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos taurus*) cattle. *Animal Genetics* **41**, 232–41.
- Svensson E. & Götherström A. (2008) Temporal fluctuations of Y-chromosomal variation in *Bos taurus*. *Biology Letters* **4**, 752–4.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Table S1** Number of animal samples analyzed and sampling locations from Europe, Africa and Spain by population (left side) and the Lidia cattle breed samples analyzed by caste and *encaste* (right side).

**Table S2** Haplotype correspondence among bovine Y-chromosome studies: this study, Pérez-Pardal *et al.* (2010), Cortés *et al.* (2011).

**Table S3** Frequency of Y-chromosome haplotypes per populations (H/P), castes and *encastes* and average  $F_{ST}$  distance values for each population compared to the rest of the populations ( $F_{ST} \pm$  standard deviation).

**Table S4** AMOVA for Lidia cattle breed Y-chromosome haplotypes by fitting two hierarchical levels: caste and *encaste* within caste.

**Table S5** Allele frequencies of the Y-chromosome microsatellites.

Table S1. Number of animal samples analyzed and sampling locations from Europe, Africa and Spain by population (left side) and the Lidia cattle breed samples analyzed by caste and *encaste* (right side).

EUROPEAN POPULATIONS	N	SAMPLING LOCATIONS	AFRICAN POPULATIONS	N	SAMPLING LOCATIONS	BREED (Group)	CASTE	ENCASTE	N	SAMPLING LOCATIONS	
Angus	13	UK	Bovin d'Oulmes	5	Morocco	LIDIA CATTLE BREED	1. Cabrera	Miura	40	Andalucía	
Blanc-Bleu Belge	15	Belgium	Bovin de Tidili	5	Morocco		2. Gallardo	Pablo Romero	15	Andalucía	
Blonde d'Aquitaine	5	France	Lobi	8	Burkina Faso		3. Navarra	Navarra	15	Navarra	
Brown Swiss	14	Switzerland	N'Dama	9	Guinea		4. Vazqueña	Braganza	15	Portugal	
Charolais	5	France	SPANISH POPULATIONS		N			Concha y Sierra	15	Andalucía	
Chianina	20	Italy						Veragua	16	Andalucía	
Croatian Simmental	13	Croatia	Alistana	9	Castilla y León		5. Vistahermosa	Atanasio Fernández	25	Castilla y León	
Danish Red	10	Denmark	Asturiana de la Montaña	19	Asturias			Baltasar Iban	15	Madrid	
Dexter	4	Ireland	Asturiana de los Valles	38	Asturias			Benítez Cubero	4	Andalucía	
Fleckvieh	4	Switzerland	Berrenda Negra	7	Andalucia			Conde de la Corte	30	Extremadura	
European Friesian	8	Germany	Berrenda Colorada	15	Andalucia			Contreras	15	Andalucía	
Galloway	2	UK	Betizu	10	Navarra			Domecq	110	Andalucía	
Hereford	8	UK	Bruna dels Pirineus	11	Cataluña			Gamero Cívico	25	Castilla La Mancha	
Holstein	37	The Netherlands	Cárdena	8	Andalucia			Gamero Cívico/Salttillo	15	Andalucía	
Istrian	4	Croatia	Morucha	17	Castilla y León			Marqués de Albaserada	20	Andalucía	
Jersey	5	The Netherlands	Lidia Cattle breed	722				Murube Urquijo	63	Andalucía	
Limousin	4	France	Pajuna	4	Andalucia			Núñez	56	Andalucía	
Maremmiana	19	Italy	Parda de Montaña	26	Castilla y León			Núñez/Domecq	6	Extremadura	
Normando	39	France	Pirenaica	10	Navarra			Pedrajas	15	Andalucía	
Parthenais	15	France	Retinta	16	Andalucia			Salttillo	18	Andalucía	
Piemontese	6	Italy	Rubia Gallega	31	Galicia			Santa Coloma	57	Andalucía	
Pinzgauer	9	Austria	Sayaguesa	4	Castilla y León			Santa Coloma-Urcola	15	Andalucía	
Salers	15	France	Serrana Soriana	3	Castilla y león			Torrestrella/Domecq	13	Castilla La Mancha	
Simmenthal	4	Germany	Tudanca	8	Cantabria			Urcola	14	Extremadura	
Tarentaise	18	France					6. Vistahermosa crosses	Veragua/Domecq	7	Andalucía	
Tyrolean Grey	19	Austria						Hidalgo Barquero	35	Andalucía	
								Vega Villar	40	Castilla y León	
							7. Castes Mixed group	Veragua/Gamero Cívico	8	Andalucía	

Table S2. Haplotype correspondence among bovine Y-chromosome studies: this study, Pérez-Pardal *et al.* (2010), Cortés *et al.* (2011).

Microsatellites and ZFY10 <i>indel</i> alleles						Haplotypes		
<i>BM861</i>	<i>BYM1</i>	<i>INRA189</i>	<i>UMN0103</i>	<i>UMN0307</i>	<i>zfy10</i>	Haplotype This study.	Pérez-Pardal et al. (2010)	Cortés et al. (2011)
156	252	152	122	151	285	Y1H1	Y1_1	not observed
156	252	156	122	151	285	Y1H2	Y1_2	not observed
156	254	156	120	151	285	Y1H3	Y1_3	not observed
156	254	156	122	155	285	Y1H4	Y1_6	H9
156	254	156	122	151	285	Y1H5	Y1_4 / Y1_5 / Y1_8	not observed
156	254	156	122	157	285	Y1H6	Y1_7	not observed
156	254	158	122	155	285	Y1H7	Y1_9	not observed
156	256	154	122	157	285	Y1H8	Y1_10	not observed
156	256	156	112	151	285	Y1H9	Y1_11	not observed
156	256	156	116	151	285	Y1H10	not observed	H4
156	256	156	122	151	285	Y1H11	not observed	H3
156	250	160	126	151	287	Y2H1	Y2_1	not observed
156	250	160	130	149	287	Y2H2	Y2_2	not observed
156	252	148	122	151	287	Y2H3	Y2_3	not observed
156	252	148	128	151	287	Y2H4	Y2_4	not observed
156	252	158	128	151	287	Y2H5	Y2_5	not observed
156	252	160	126	151	287	Y2H6	Y2_7	not observed
156	252	160	130	149	287	Y2H7	Y2_6	not observed
156	252	162	132	149	287	Y2H8	Y2_8	not observed
156	252	164	128	151	287	Y2H9	Y2_9	not observed
156	254	148	122	151	287	Y2H10	Y2_11	not observed
156	254	152	130	149	287	Y2H11	Y2_12	H5
156	254	156	130	149	287	Y2H12	not observed	H7
156	254	158	130	149	287	Y2H13	Y2_13	not observed
156	254	158	132	149	287	Y2H14	Y2_14	not observed
156	254	158	134	149	287	Y2H15	Y2_15	not observed
156	254	160	128	149	287	Y2H16	Y2_17	not observed
156	254	160	130	149	287	Y2H17	Y2_16 / Y2_19 / Y2_20	H1
156	254	162	130	149	287	Y2H18	Y2_22	H2
156	254	162	130	135	287	Y2H19	Y2_21	not observed
156	254	162	132	149	287	Y2H20	Y2_23	not observed
156	254	164	130	149	287	Y2H21	Y2_24	not observed
156	256	160	130	149	287	Y2H22	Y2_26	H10
156	256	162	130	149	287	Y2H23	not observed	H8
156	256	164	130	151	287	Y2H24	Y2_27	not observed
158	254	160	130	149	287	Y2H25	Y2_25	not observed
156	252	166	128	151	287	Y2H26	Y2_10	not observed
156	254	160	130	147	287	Y2H27	Y2_18	H6

Table S3. Frequency of Y-chromosome haplotypes per populations (H/P), castes and *encastes* and average  $F_{ST}$  distance values for each population compared to the rest of the populations ( $F_{ST} \pm$  standard deviation).

H/P	Y1_1	Y1_2	Y1_3	Y1_4	Y1_5	Y1_6	Y1_7	Y1_8	Y1_9	Y1_10	Y1_11	Y2_1	Y2_2	Y2_3	Y2_4	Y2_5	Y2_6	Y2_7	Y2_8	Y2_9	Y2_10	Y2_11	Y2_12	Y2_13	Y2_14	Y2_15	Y2_16	Y2_17	Y2_18	Y2_19	Y2_20	Y2_21	Y2_22	Y2_23	Y2_24	Y2_25	Y2_26	Y2_27	Aver_FST ± S.d.		
European																																									
Angus					13																																			0,89± 0,000	
Blanc-Bleu Belge					2			13																																	0,81± 0,000
Blonde d'Aquitaine																											3		1			1									0,42± 0,165
Brown Swiss																												14												0,49± 0,260	
Charolais																													5											0,42± 0,362	
Chianina																																20								0,85± 0,000	
Croatian Simmental				3																									10											0,33± 0,147	
Danish Red					9																									1										0,73± 0,031	
Dexter		4																																						0,85± 0,008	
Fleckvieh																													4											0,41± 0,407	
European Friesian				7		1																																		0,82± 0,057	
Galloway																														1		1								0,53± 0,215	
Hereford							7																							1										0,75± 0,003	
Holstein				37																																				0,87± 0,042	
Istrian																													4											0,41± 0,406	
Jersey																			5																					0,86± 0,003	
Limousin																											1		3											0,43± 0,265	
Maremma a																														19										0,52± 0,240	
Normando					39																																			0,87± 0,042	
Parthenais					4																										11									0,32± 0,128	
Piemontese													1														1		4											0,39± 0,270	
Pinzgauer																														9										0,46± 0,287	
Salers				1																											14									0,39± 0,251	
Simmenthal																														4										0,41± 0,405	
Tarentaise																															18									0,51± 0,242	
Tyrolean Grey																									2						17									0,46± 0,174	



Table S3. Cont.

H/P	Y1_1	Y1_2	Y1_3	Y1_4	Y1_5	Y1_6	Y1_7	Y1_8	Y1_9	Y1_10	Y1_11	Y2_1	Y2_2	Y2_3	Y2_4	Y2_5	Y2_6	Y2_7	Y2_8	Y2_9	Y2_10	Y2_11	Y2_12	Y2_13	Y2_14	Y2_15	Y2_16	Y2_17	Y2_18	Y2_19	Y2_20	Y2_21	Y2_22	Y2_23	Y2_24	Y2_25	Y2_26	Y2_27	Aver_Fst ± Sd		
African																																									
Bovin d'Oulmes																		1											4												0,42± 0,229
Bovin de Tidili												1														2			2												0,42± 0,095
Lobi																	1			4															2			1		0,71± 0,001	
N'Dama			1		1									4	1	1						1																		0,64± 0,001	
Spanish																																									
Alistana																																	9								0,83± 0,002
Asturiana de Montaña	18																												1												0,83± 0,002
Asturiana de Valle	26			6																									6												0,55± 0,004
Berrenda Negra									6																						1										0,72± 0,012
Berrenda Colorada											2																		1	6	3				3						0,45± 0,024
Betizu																																						10			0,86± 0,001
Bruna dels Pirineus																											3	8													0,45± 0,111
Cárdena									1																					3	4										0,37± 0,119
Morucha																													5	5					7						0,42± 0,051
Pajuna									1																				2					1							0,36± 0,196
Parda de Montaña				1																										25											0,44± 0,255
Pirenaica																													8	2											0,42± 0,157
Retinta				1																												9									0,47± 0,020
Rubia Gallega																													31												0,54± 0,228
Sayaguesa																													2	1					1						0,40± 0,251
Serrana Soriana																																		2	1						0,55± 0,073
Tudanca									8																																0,88± 0,010

Table S3. Cont.

H/P	Y1_1	Y1_2	Y1_3	Y1_4	Y1_5	Y1_6	Y1_7	Y1_8	Y1_9	Y1_10	Y1_11	Y2_1	Y2_2	Y2_3	Y2_4	Y2_5	Y2_6	Y2_7	Y2_8	Y2_9	Y2_10	Y2_11	Y2_12	Y2_13	Y2_14	Y2_15	Y2_16	Y2_17	Y2_18	Y2_19	Y2_20	Y2_21	Y2_22	Y2_23	Y2_24	Y2_25	Y2_26	Y2_27	Aver_Fst ± S.d		
Castes/ encastes																																									
Cabrera caste																																									0,81± 0,001
Miura																													2											38	
Gallardo Caste																																									0,88± 0,000
Pablo Romero																																									
Navarra caste																																									0,56± 0,014
Vazqueñ a caste																																									0,55± 0,217
Braganza Concha y Sierra Veragua																																									
Vistaher- mosa caste																																									0,29± 0,129
Atanasio Fdez. Baltasar Iban Benítez Cubero Conde de la Corte Contrera Domecq Gamero Cívico Gamero Cívico/ Saltillo																																									
Marqués Albaserr- adaa																																									
Murube Urquijo Núñez Núñez/ Domecq Pedrujas Saltillo Sta. Coloma Sta. Coloma/ Urcola Torrestre Ila/ Domecq Urcola Veragua/ Domecq																																									
Vistaher mosa crosses																																									0,73± 0,001
Hidalgo Banquero Vega Villar																																									
Castes mixed																																									0,45± 0,292
Veragua/ Gamero Cív.																																									
Total	44	4	1	107	20	1	7	13	16	2	117	1	1	4	1	1	1	1	5	4	1	2	3	2	2	1	4	770	50	12	1	3	23	14	2	10	1	48	1300		

Table S4. AMOVA for Lidia cattle breed Y-chromosome haplotypes by fitting two hierarchical levels; caste and *encaste* within caste. This AMOVA analysis was restricted to individuals belonging to the Lidia cattle breed, excluding castes originated from crosses.

Source of variation	N	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among castes	4	42.049	0.169	49.19
Among <i>encastes</i> within castes	14	35.823	0.103	29.87
Within <i>encastes</i>	434	31.382	0.072	20.94
Overall	452	109.254	0.345	
<hr/>				
F statistics		FCT (P)	FST (P)	FSC (P)
		0.492 (>0.0058)	0.791 (<0.0000)	0.588 (>0.0000)

Table S5. Allele frequencies of the Y-chromosome microsatellites.

Locus	Allele	Frequency			Comments
		Total	Y1	Y2	
<i>BYM1</i>	250	0,002	0,000	0,002	
	252	0,051	0,145	0,019	
	254	0,804	0,410	0,939	
	256	0,144	0,446	0,040	
<i>BM861</i>	156	0,992	1,000	0,990	
	158	0,008	0,000	0,010	Exclusive in Spain
<i>INRA189</i>	148	0,005	0,000	0,006	Exclusive in Africa
	152	0,035	0,133	0,002	
	154	0,010	0,039	0,000	Exclusive in Europe
	156	0,208	0,807	0,003	
	158	0,010	0,021	0,006	
	160	0,661	0,000	0,887	
	162	0,063	0,000	0,085	
	164	0,007	0,000	0,009	
	166	0,001	0,000	0,001	Exclusive in Africa
<i>UMN0103</i>	112	0,012	0,048	0,000	Exclusive in Spain
	116	0,002	0,006	0,000	Exclusive in Spain (Lidia)
	120	0,001	0,003	0,000	Exclusive in Africa
	122	0,245	0,943	0,005	
	126	0,002	0,000	0,002	Exclusive in Africa
	128	0,008	0,000	0,011	
	130	0,724	0,000	0,972	
	132	0,006	0,000	0,008	
	134	0,001	0,000	0,001	Exclusive in Europe
<i>UMN0307</i>	135	0,009	0,000	0,012	Exclusive in Spain
	147	0,037	0,000	0,050	Exclusive in Spain (Lidia)
	149	0,686	0,000	0,921	
	151	0,169	0,614	0,017	
	155	0,088	0,343	0,000	
	157	0,011	0,042	0,000	Exclusive in Europe
<i>zfy10</i>	285	0,255	1	0	
	287	0,745	0	1	



### 3.1.2 ARTÍCULO 2 (CAPÍTULO I). IDENTIFICATION OF A NEW Y CHROMOSOME HAPLOGROUP IN SPANISH NATIVE CATTLE

Título (español): IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO HAPLOGRUPO EN EL CROMOSOMA Y EN EL VACUNO AUTÓCTONO ESPAÑOL

Authors: **Rocío Pelayo**<sup>a</sup>, Cecilia Penedo<sup>b</sup>, Mercedes Valera<sup>a</sup>, Antonio Molina<sup>c</sup>, Catarina Ginja<sup>d</sup>, Luis J. Royo<sup>e</sup>

Affiliations: <sup>a</sup>Department of Agro-Forestry Sciences, ETSIA, University of Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>b</sup>Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, CA, United States; <sup>c</sup>Department of Genetics, University of Córdoba, Crta \_Nacional IV, km 396, 14071, Córdoba, Spain; <sup>d</sup>CIBIO-InBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Vairão, Portugal; <sup>e</sup>Área de Nutrición, Pastos y Forrajes, SERIDA, Crta de Oviedo s/n, 33300, Villaviciosa (Asturias), Spain.

Publication: **Animal Genetics (2017). DOI: 10.1111/age.12549. In press.**

- Impact Index: 1,779 (Journal Citation Report, 2015).
- Subject and Quartile: "Genetics and heredity", 1st quartile.





## Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle

Journal:	<i>Animal Genetics</i>
Manuscript ID	AnGen-16-06-0215.R2
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Pelayo, Rocio; University of Seville, Agroforestry Science; University of Cordoba, Genetics</p> <p>Penedo, Maria Cecilia; University of California, Veterinary Genetics Laboratory</p> <p>Valera, Mercedes; Universidade de Sevilla, Departamento de Ciencias Agroflorestales</p> <p>Molina, Antonio; Universidad de Córdoba, Departamento de Genética</p> <p>Ginja, Catarina; University of California, Veterinary Genetics Laboratory; Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Genética e Melhoramento Animal</p> <p>Millon, Lee; University of California, Veterinary Genetics Laboratory</p> <p>Royo, Luis; SERIDA, Área de Genética y Reproducción Animal</p>
Keywords:	genetic diversity, Spanish cattle, Y-haplotype.

SCHOLARONE™  
Manuscripts



**1 Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle**

**2 R. Pelayo, M.C.T. Penedo, M. Valera, A. Molina, C. Ginja, L. Millon, L.J. Royo.**

3 R. Pelayo, M. Valera

4 Dpt. of Agroforestry Science, University of Seville,

5 Crta. Utrera, Km 1, 41013, Seville, Spain.

6 Email: [rociopaga555@gmail.com](mailto:rociopaga555@gmail.com)

7 Telephone number: +34957211070

8 Fax: +34957218735del

9 M.C.T. Penedo

10 Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine,

11 University of California Davis, CA, United States.

12 A. Molina.

13 Dpt. of Genetics, University of Córdoba,

14 Crta \_Nacional IV, km 396, 14071, Córdoba, Spain.

15 C. Ginja

16 CIBIO-InBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos,

17 Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Vairão, Portugal.

18 L. Millon

19 Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine,

20 University of California Davis, CA, United States.

21 L.J. Royo.

22 Área de Nutrición, Pastos y Forrajes, SERIDA,

23 Crta de Oviedo s/n, 33300, Villaviciosa (Asturias), Spain.

## 24 25 **Summary**

26  
27 The aim of this work was to perform a thorough analysis of the diversity of Y-  
28 haplotypes in Spanish cattle. A total of 207 *Bos taurus* males were sampled across 25  
29 European breeds, with a special focus on rare, local Spanish populations. Animals were  
30 genotyped with 5 Y-specific microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*, *UMN0307*, *BM861*,  
31 and *BYM1*), two indels (*ZFY10* and *USP9Y*) and one SNP (*UTY19*). A new haplogroup,  
32 distinct from those described by Götherström *et al.* (2005), was identified and named  
33 Y1.2. Samples representing the three *B. taurus* Y-haplogroups were genotyped for four  
34 additional Y chromosome SNPs (*rs121919254*, *rs121919281*, *rs121919323*,  
35 *rs137049553*). Among these SNPs only *rs121919281* was informative in *B. taurus* and  
36 helped to confirm the new Y1.2 haplogroup. Analysis of a larger dataset of  
37 standardized haplotypes for 1507 individuals from 57 populations, from Spain, other  
38 European countries, and Africa, showed the new Y1.2 haplogroup to be exclusively  
39 found in Spanish breeds. This finding reinforces the importance of local Spanish cattle  
40 as reservoirs of genetic diversity, as well as the importance of Iberian Peninsula in the  
41 history of cattle.

42  
43 **Keywords:** Spanish cattle, genetic diversity, Y-haplotype.

44  
45 Two major haplogroups can be distinguished in *Bos taurus* cattle, Y1 and Y2  
46 (Götherström *et al.* 2005). These haplogroups show a geographical pattern distribution  
47 across Europe, with Y1 haplogroup more frequent in the north, and Y2 in the south and

central Europe. While some authors argue that such a pattern is the result of modern practices of cattle breeding (Svensson & Götherström 2008), rather than historical events, others consider that the Y1 and Y2 distribution reflects founder effects associated with the development and expansion of two different groups of dairy cattle (Edwards *et al.* 2011). We observed the presence of two Y1 haplotypes exclusive of Spanish cattle, from the South to the North, which contradicted earlier studies and suggested that Y1 haplogroup was more widely distributed than previously assumed (Pérez-Pardal *et al.* 2010). A paternal African subfamily has been described by Pérez-Pardal *et al.* (2010) showing four and 12 Y-chromosome exclusive alleles and haplotypes, respectively. In Spain, five and 12 exclusive Y-chromosome alleles and haplotypes, respectively, were also found (Pelayo *et al.* 2015), showing that cattle from Spain retain distinct historic signatures within the species.

Under this scenario, our aim was to perform a thorough analysis of the diversity of Y-haplotypes in Spanish cattle. We focused our sampling on local Spanish cattle breed that had not been studied before as well as additional animals from distinct populations located in regions where cattle have high levels of genetic diversity. We also used four Y-chromosome specific SNP markers which had not been screened in these cattle populations.

a) Identification of a new Y-chromosome haplogroup in Spanish cattle.

A total of 207 *B. taurus* males were sampled across 25 European breeds, 15 of those are Spanish breeds, besides, one additional Spanish breed (Lidia breed) is split into lineages (Castes) and from six of them samples are taken: two lineages in the Northern, two in the Center, and two in the Southern (Table S1). Animals were genotyped with: eight Y-specific markers (Götherström *et al.* 2005; Pérez-Pardal *et al.* 2010; Bonfiglio *et al.* 2012) (see Supplementary Methods). Alleles for microsatellites (*INRA189*,

73 *UMN0103*, *UMN0307*, *BM86I*, and *BYMI*), single nucleotide polymorphisms (SNP)  
 74 (*UTY19*), and *ZFY10* and *USP9Y* indels were combined, resulting in twenty distinct  
 75 haplotypes (Table S2). Following the nomenclature of Götherström *et al.* (Götherström  
 76 *et al.* 2005), five haplotypes belonged to haplogroup Y1 (25 %), 13 to haplogroup Y2  
 77 (65 %) and two which did not belong to either and were included in haplogroup Y1.2  
 78 (10 %) not previously reported.

79 b) Confirmation of the new Y-chromosome haplogroup.

80 Sixty DNA samples were genotyped by using the eight markers described earlier. These  
 81 samples represented the three *B. taurus* Y-haplogroups and most of the Y-haplotypes  
 82 described, as well as six *B. indicus* Y-haplotypes (3 Gir and 3 Nelore samples, Y3  
 83 haplogroup). Likewise, four Y-specific SNPs (*rs121919254*, *rs121919281*,  
 84 *rs121919323*, *rs137049553*, Table S3, see Supplementary Methods) which were not  
 85 considered in previous studies including some or all of the markers described above,  
 86 were also used. Coincidentally, *rs121919254* and *rs121919281* were also included in an  
 87 independent panel of 9 Y-SNPs reported by Boichard *et al.* (2012). Among these SNPs,  
 88 only *rs121919281* was informative in *B. taurus* and helped to confirm the new  
 89 haplogroup Y1.2 (Table S4). An UPGMA tree, based on the five polymorphic SNPs  
 90 and two indels, was constructed with MEGA6 software (Tamura *et al.* 2013), in order to  
 91 determine the relationship among *B. taurus* haplogroups, and including *B. indicus*  
 92 haplogroup as an outgroup (Figure 1). The UPGMA tree showed that the new *B. taurus*  
 93 Y1.2 is clearly different from *B. indicus* Y3 haplogroup, and appears to be more related  
 94 to the Y1 haplogroup. While Y1 and Y2 haplogroups differ in two SNPs (*UTY19* and  
 95 *rs121919281*) and two indels (*ZFY10* and *USP9Y*), Y1.2 differs by one SNP and one  
 96 indel from either Y1 (*rs121919281* and *USP9Y*) or Y2 (*UTY19* and *ZFY10*).  
 97 Nonetheless, the low number of SNPs available to construct the tree did not allow to

98 establish a phylogeny of *B. taurus* Y-haplogroups with high confidence bootstrap  
99 values.

100 Haplotype distribution and frequency per breed are shown in Table S1. A median-  
101 joining network combining information on five microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*,  
102 *UMN0307*, *BM861*, and *BYM1*) , one SNP (*UTY19*) and two indels (*ZFY10* and *USP9Y*)  
103 was constructed using the program NETWORK 4.5.2 (Bandelt *et al.* 1999). Weight  
104 given to each marker followed (Perez-Pardal *et al.* 2010). The network (Figure 2)  
105 showed three distinct clusters corresponding to the Y1, Y2 and the newly identified  
106 Y1.2 haplogroup. Four Spanish breeds (belonging both to the north, center and south of  
107 Spain) were included in the Y1 cluster along with four other European breeds. The most  
108 common Y1 haplotypes in our dataset were Y1H1, observed only in Spain, and Y1H4,  
109 shared by European and Spanish breeds and being the most frequent in these European  
110 breeds. The remaining Y1 haplotypes were exclusively represented by other European  
111 breeds (Y1H2, Y1H5, and the newly described Y1H12). The Y2 cluster comprised 5  
112 European and 15 Spanish breeds. Y2H17 was the most common Y2 haplotype found in  
113 all sampling areas. In this haplogroup, four haplotypes had not been observed  
114 previously and were present at very low frequency (one animal each for Y2H29,  
115 Y2H30, Y2H31), or in a breed not previously studied (American Highland, Y2H28).

116 Among the 182 samples from the 16 Spanish breeds, there were two Y1 haplotypes  
117 (Y1H1, Y1H4) that represented 5.5 % of the animals. For the Y2 haplogroup, 10  
118 haplotypes were observed in Spanish cattle comprising 72.5 % of the animals from  
119 these breeds. Two haplotypes belonged to the new haplogroup Y1.2, representing 22 %  
120 of the Spanish samples and detected at high frequency in three breeds, 100% in  
121 Tudanca, 58 % in Berrenda and 19% in Lidia cattle.

1  
2  
3 122 Despite strong bias towards a greater representation of Spanish breeds the sampling  
4  
5 123 strategy and marker combination used, allowed for the identification of the new Y1.2  
6  
7 124 haplogroup. However, one question remains to be answered, is this Y1.2 haplogroup  
8  
9 125 exclusive of Spain?

10  
11  
12 126 c) Global distribution of Y1.2 haplogroup.

13  
14 127 To address this question, we analyzed our results in a broader context. Ten DNA  
15  
16 128 samples from Pelayo *et al.* (2015) were used for genotype standardization, extending  
17  
18 129 our study to 1507 animals belonging to 57 populations from Spain (22), other regions of  
19  
20 130 Europe (31) and Africa (4). We found an unambiguous correspondence between all  
21  
22 131 haplotypes from the present work and Pelayo *et al.* (2015), except in the case of the 5  
23  
24 132 new haplotypes found in this study. The standardization allowed to unambiguously  
25  
26 133 confirm that haplotypes found only in one dataset were indeed not present in other  
27  
28 134 datasets and were not the result of incorrect correspondence. We noted that haplotypes  
29  
30 135 belonging to the new taurine Y1.2 haplogroup were present (Y1H9 and Y1H11) in  
31  
32 136 Pelayo *et al.* (2015) and H3 in (Cortes *et al.* 2011), but corresponded to haplotypes  
33  
34 137 reported as Y1 (Table S2 and S3, respectively) due to the lower number of markers used  
35  
36 138 in these studies. Taking into account the unambiguous correspondence among the new  
37  
38 139 haplotypes detected here and those from an extensive representation of worldwide cattle  
39  
40 140 from previously published Y-chromosome data (1507 individuals from 57 populations)  
41  
42 141 we can affirm that Y1.2 haplogroup is, to our knowledge, exclusive of Spanish cattle.  
43  
44 142 This study adds to a growing knowledge about the paternal phylogeography of cattle.  
45  
46 143 Two important results arise from this work, first, a new *B. taurus* Y-haplogroup was  
47  
48 144 identified and second, local rare cattle from Spain retain significant genetic diversity  
49  
50 145 preserving unique signatures of the species evolutionary history.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 146 These findings further support evidence for the accumulation of genetic diversity in the  
4  
5 147 Iberian Peninsula (Hewitt 2001) as a result of human and livestock migrations from  
6  
7 148 Central Europe and the Near East following Mediterranean routes and from North  
8  
9 149 Africa (Beja-Pereira *et al.* 2003), as well as influences from aurochs introgression into  
10  
11 150 the domestic stock (Upadhyay *et al.* 2016). Moreover, within the minority groups of the  
12  
13 151 *B. taurus* mitochondrial DNA called P, Q, R and T1c1a1 (Miretti *et al.* 2002; Achilli *et*  
14  
15 152 *al.* 2008; Achilli *et al.* 2009), Q and T1c1a1 have been found in the Iberian Peninsula  
16  
17 153 (Miretti *et al.* 2004; Cortés *et al.* 2008; Ginja *et al.* 2010). This and the presence of Y-  
18  
19 154 chromosome haplotypes exclusively found in Spanish cattle reinforce the importance of  
20  
21 155 local and less intensively selected cattle as reservoirs of genetic diversity. Additionally,  
22  
23 156 the information described here can also be used to investigate the demographic  
24  
25 157 expansion of Spanish breeds which were introduced into several countries during  
26  
27 158 colonial periods and are considered the ancestors of Creole cattle from the Americas.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 161 **Acknowledgements.**

37  
38 162 R. Pelayo was partially founded by a grant MHE2011-00117. C. Ginja was supported  
39  
40 163 by a contract grant from the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Ref.  
41  
42 164 IF/00866/2014). The work was partially supported by the Veterinary Genetics  
43  
44 165 Laboratory, University of California, Davis, USA. We acknowledge the collaboration of  
45  
46 166 the Lidia cattle breed association (“Agrupación Española de Ganaderos de Reses  
47  
48 167 Bravas”).  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUPPORTING INFORMATION

**Table S1.** Frequency of Y chromosome haplotypes, defined by five microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*, *UMN0307*, *BM861*, and *BYM1*), one SNP (*UTY19*), and two indels (*ZFY10* and *USP9Y*), in each population. Breed names, sample sizes and geographic locations are shown.

**Table S2.** Multi-locus composition of the haplotypes defined in this study, and correspondence to the nomenclature of previously published Y-chromosome data by Pelayo *et al.* (2015) and Edwards *et al.* (2011).

**Table S3.** Position of the four additional Y chromosome SNPs the BovineHD BeadChip (Illumina, San Diego, CA) and primers used in this study.

**Table S4.** Combinations of SNP and indel genotypes that define each haplogroup.

**Table S5.** List of markers assigned to the Y-chromosome on the BovineHD BeadChip (Illumina, San Diego, CA) screened for this study.

**Figure S1.** Network constructed with Y chromosome haplotype data based on the eight markers defined in Table S2 from 1507 animals (1300 samples from Pelayo *et al.* (2015) and 207 samples from this study). Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and geographic breed groups are colour coded.

## Supplementary Methods



Figure 1. UPGMA tree constructed with MEGA6 software using five polymorphic SNPs (*rs121919254*, *rs121919281*, *rs121919323*, *rs13704955* and *UTY19*) and two indels (*ZFY10* and *USP9Y*) in order to define the relationship among *B. taurus* Y1, Y2 and Y1.2 haplogroups, and including *B. indicus* Y3-haplogroup as an outgroup.

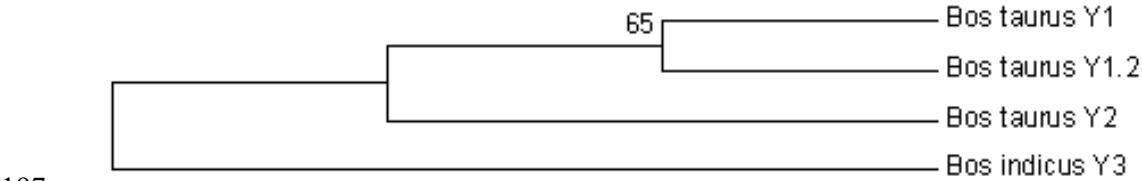
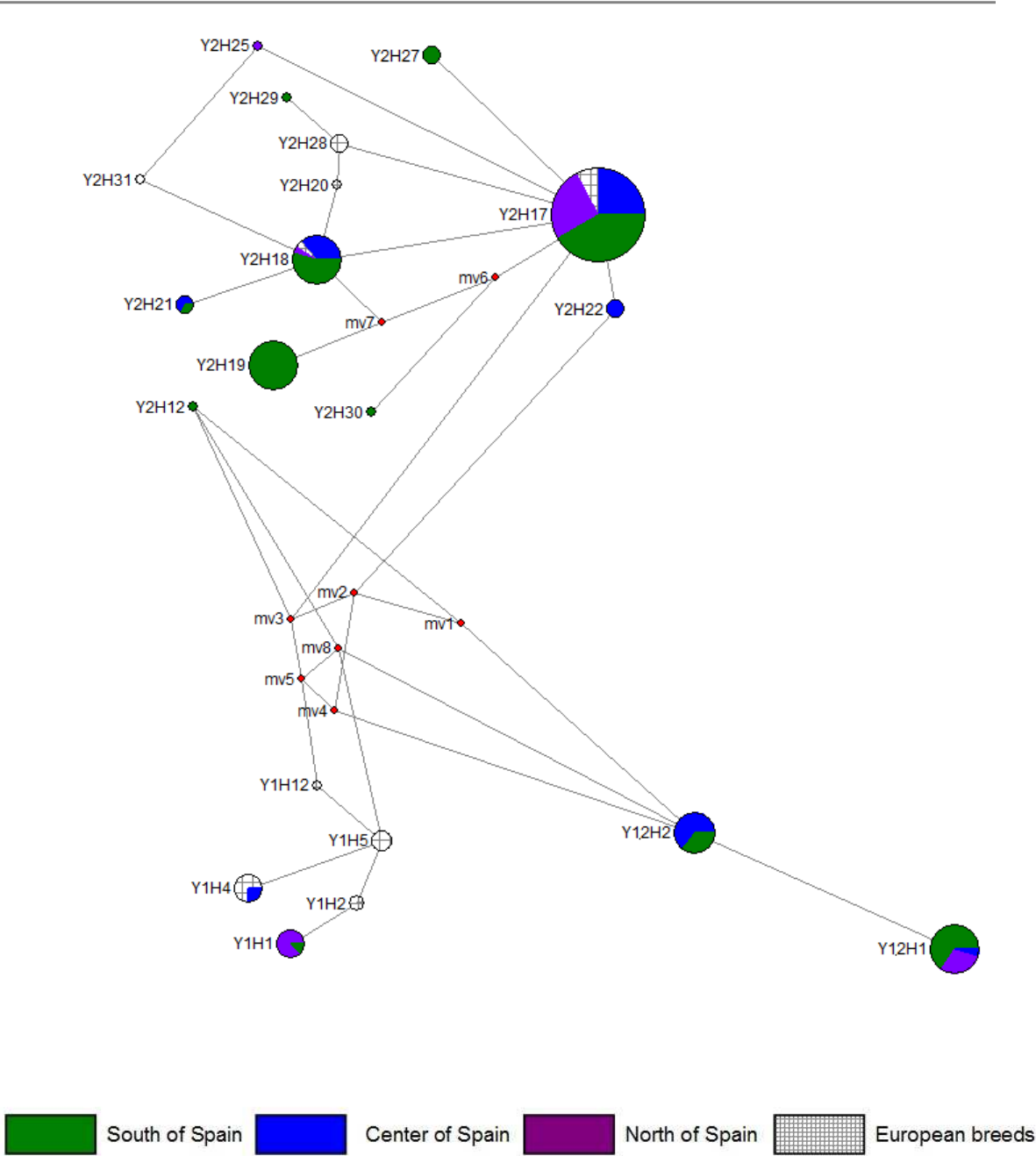


Figure 2. Network constructed with Y chromosome haplotype data obtained for five microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*, *UMN0307*, *BM861*, and *BYM1*), one SNP (*UTY19*) and two indels (*ZFY10* and *USP9Y*) in 207 animals sampled in this study. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and geographic breed groups are colour coded.



206 REFERENCES

207 Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A., Malusà A., Pala M., Kashani B.H., Perego U.A.,  
208 Ajmone-Marsan P., Liotta L., Semino O., Bandelt H.J., Ferretti L. & Torroni A.  
209 (2009) The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial  
210 genome. *PLoS One* **4**.  
211 Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Uboldi C., Colli L., Al-Zahery N., Accetturo M.,  
212 Pala M., Kashani B.H., Perego U.A., Battaglia V., Fornarino S., Kalamati J.,  
213 Houshmand M., Negrini R., Semino O., Richards M., Macaulay V., Ferretti L.,  
214 Bandelt H.J., Ajmone-Marsan P. & Torroni A. (2008) Mitochondrial genomes of  
215 extinct aurochs survive in domestic cattle. *Current Biology* **18**, R157-R8.  
216 Bandelt H.J., Forster P. & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring  
217 intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.  
218 Beja-Pereira A., Alexandrino P., Bessa I., Carretero Y., Dunner S., Ferrand N., Jordana  
219 J., Laloe D., Moazami-Goudarzi K., Sanchez A. & Cañon J. (2003) Genetic  
220 characterization of Southwestern European bovine breeds: A historical and  
221 biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of*  
222 *Heredity* **94**, 243-50.  
223 Boichard D., Chung H., Dasonneville R., David X., Eggen A., Fritz S., Gietzen K.J.,  
224 Hayes B.J., Lawley C.T., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., VanRaden P.M.,  
225 Viaud-Martinez K.A., Wiggans G.R. & for the Bovine L.D.C. (2012) Design of  
226 a Bovine Low-Density SNP Array Optimized for Imputation. *PLoS One* **7**,  
227 e34130.  
228 Bonfiglio S., De Gaetano A., Tesfaye K., Grugni V., Semino O. & Ferretti L. (2012) A  
229 novel USP9Y polymorphism allowing a rapid and unambiguous classification of  
230 *Bos taurus* y chromosomes into haplogroups. *Animal Genetics* **43**, 611-3.  
231 Cortes O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., Fernández J. & Cañón J. (2011) Y  
232 chromosome genetic diversity in the Lidia bovine breed: A highly fragmented  
233 population. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **128**, 491-6.  
234 Cortés O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., García-Atance M.A., García D., Fernández J.  
235 & Cañón J. (2008) Ancestral matrilineages and mitochondrial DNA diversity of  
236 the Lidia cattle breed. *Animal Genetics* **39**, 649-54.  
237 Edwards C.J., Ginja C., Kantanen J., Pérez-Pardal L., Tresset A., Stock F., Gama L.T.,  
238 Penedo M.C.T., Bradley D.G., Lenstra J.A. & Nijman I.J. (2011) Dual origins of  
239 dairy cattle farming - Evidence from a comprehensive survey of european Y-  
240 chromosomal variation. *PLoS One* **6**.  
241 Ginja C., Penedo M.C.T., Melucci L., Quiroz J., Martínez López O.R., Revidatti M.A.,  
242 Martínez-Martínez A., Delgado J.V. & Gama L.T. (2010) Origins and genetic  
243 diversity of New World Creole cattle: Inferences from mitochondrial and y  
244 chromosome polymorphisms. *Animal Genetics* **41**, 128-41.  
245 Götherström A., Anderung C., Hellborg L., Galil R., Smith E.C., Bradley D.G. &  
246 Ellegren H. (2005) Erratum: Cattle domestication in the Near East was followed  
247 by hybridization with aurochs bulls in Europe (Proceedings of the Royal Society  
248 - Biological Sciences (Series B) (November 22, 2005) 272 (2345-2350) DOI:  
249 10.1098/rspb.2005.3243). *Proceedings of the Royal Society B: Biological*  
250 *Sciences* **272**, 2660.  
251 Hewitt G.M. (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - Or seeing genes in  
252 space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-49.

- 253 Miretti M.M., Dunner S., Naves M., Contel E.P. & Ferro J.A. (2004) Predominant  
254 African-derived mtDNA in Caribbean and Brazilian creole cattle is also found in  
255 Spanish cattle (*Bos taurus*). *Journal of Heredity* **95**, 450-3.
- 256 Miretti M.M., Pereira Jr H.A., Poli M.A., Contel E.P.B. & Ferro J.A. (2002) African-  
257 derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*):  
258 Evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *Journal of Heredity* **93**, 323-  
259 30.
- 260 Pelayo R., Valera M., Molina A. & Royo L.J. (2015) Contribution of Lidia cattle breed  
261 historical castes to the paternal genetic stock of Spain. *Animal Genetics* **46**, 312-  
262 5.
- 263 Perez-Pardal L., Royo L.J., Beja-Pereira A., Curik I., Traore A., Fernandez I., Solkner  
264 J., Alonso J., Alvarez I., Bozzi R., Chen S., Ponce de Leon F.A. & Goyache F.  
265 (2010) Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos*  
266 *taurus*) cattle. *Anim Genet* **41**, 232-41.
- 267 Pérez-Pardal L., Royo L.J., Beja-Pereira A., Curik I., Traoré A., Fernández I., Sölkner  
268 J., Alonso J., Álvarez I., Bozzi R., Chen S., Ponce De León F.A. & Goyache F.  
269 (2010) Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos*  
270 *taurus*) cattle. *Animal Genetics* **41**, 232-41.
- 271 Svensson E. & Götherström A. (2008) Temporal fluctuations of Y-chromosomal  
272 variation in *Bos taurus*. *Biology Letters* **4**, 752-4.
- 273 Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular  
274 evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**,  
275 2725-9.
- 276 Upadhyay M.R., Chen W., Lenstra J.A., Goderie C.R.J., MacHugh D.E., Park S.D.E.,  
277 Magee D.A., Matassino D., Ciani F., Megens H.J., van Arendonk J.A.M.,  
278 Groenen M.A.M., European Cattle Genetic Diversity C. & Crooijmans R.  
279 (2016) Genetic origin, admixture and population history of aurochs (*Bos*  
280 *primigenius*) and primitive European cattle. *Heredity*.

Supplementary Methods

Animals were genotyped with five Y-specific microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*, *UMN0307*, *BM861*, and *BYM1*) and *ZFY10* indel following Perez-Pardal et al (2010) and Pelayo et al (2015) in a 16-capillary 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and GenMapper software 3.7 (Applied Biosystems) was used for allele calling. USP9Y indel (81-base pair indel in USP9Y intron 26, Bonfiglio et al, 2012) was genotyped based on PCR product size difference following agarose gel electrophoresis. *UTY19* SNP (A/C SNP in *UTY* intron 19, Götherström et al, 2005) was genotyped by means of a High Resolution Melt (HRM) protocol, using primers *UTY19-F* and *UTY19-R-bio* (133 bp fragment) described in Svensson and Götherström (2008). The PCR assay was performed using the Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Madrid, Spain) in a total volume of 15 µl containing: 1× MeltDoctor HRM™ Master mix, 0.25 µM of each primer, and 25–50 ng of DNA. The real-time PCR program consisted of 40 amplification cycles and two steps: denaturation for 20 s at 95 °C and annealing–elongation for 40 s at 60 °C. The fluorescent signals were detected in real time during the annealing–elongation step. Each assay included two samples of known genotype and one no-template control (NTC). Melting curve shapes were analyzed for each amplicon by the StepOne HRM analysis software (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and visual inspection, and genotyped based on HRM Software v3.0.1 (Applied Biosystems). Genotypes of unknown samples were considered reliable only if the results for reference samples were correct, and NTC yielded no result.

In addition, one hundred and one SNPs (Table S5, see Supporting Information) were randomly selected from among the list of markers assigned to the Y-chromosome on the BovineHD BeadChip (Illumina, San Diego, CA) manifest. Four multiplexed assays for the Mass Array platform (Agena, San Diego, CA) using the iPlex chemistry were designed and used to screen DNA samples following the protocol recommended by the manufacturer. Among the selected SNPs, four markers – *rs121919254* (*BovineHD3100000103*), *rs121919281* (*BovineHD3100000210*), *rs121919323* (*BovineHD3100001409*), *rs137049553* (*BovineHD3100001443*) – were identified that provided robust genotype data akin to single-locus expectations and were male-specific. The remaining SNPs were excluded because, under our assay design conditions and without further optimization, they were not male-specific, failed to amplify

some males thus suggesting lower assay sensitivity, or showed polymorphism in males consistent with more than one copy being detected. These four SNPs were used in this study to genotype 60 DNA samples representing all three *B. taurus* haplogroups and most of the haplotypes described (Table S2), as well as six *B. indicus* haplotypes.

For Peer Review

Table S1. Frequency of Y chromosome haplotypes defined by five microsatellites (*INRA189*, *UMN0103*, *UMN0307*, *BM861*, and *BYM1*), one SNP (*UTY19*), and two indels (*ZFY10* and *USP9Y*), in each population. Breed names, sample sizes and geographic locations are shown.

		Y1_ H1	Y1_ H2	Y1_ H4	Y1_ H5	Y1.2_ H1	Y1.2_ H2	Y1_ H12	Y2_ H12	Y2_ H17	Y2_ H18	Y2_ H19	Y2_ H20	Y2_ H21	Y2_ H22	Y2_ H25	Y2_ H27	Y2_ H28	Y2_ H29	Y2_ H30	Y2_ H31		
Northern	Spanish breeds	N																					
	Asturiana de la Montaña	4	3								1												
	Asturiana de los Valles	5	4								1												
	Betizu	3								2													
	Monchina	6								6													
	Pirenaica	2								2													
	Terreña	2								2													
	TdL (Navarra Caste)	3								2													
	TdL (Vistahermosa Caste)	5								5													
	Tudanca	7	7																				
Center	Avileña	8	2			1		3															
	Morucha	8								5													
	TdL (Vazqueña) caste)	6								6													
	TdL (Vistahermosa Caste)	26								11													
Southern	Berrenda Colorada	18				5	2	3															
	Berrenda Negra	13	1				8	3	1														
	Cárdena	6								1													
	Mostrenca	4								5													
	Pajuna	6				1			4														
	Retinta	20				1			2														
	TdL (Cabrera Caste)	3								1													
	TdL (Vistahermosa Caste)	27								18													
	other European breeds																						
	American Highland	3								3													
	Ayrshire	1	1																				
	Blonde Aquitania	1								1													
	Dexter	2	2																				
	Gelbvieh	3								3													
	Holstein-Friesian	5	5																				
	Marchigiana	1								1													
	Shorthorn	5				4	1																
	Simmental	4								3													
	Overall	207	8	2	8	4	23	17	1	1	82	22	22	1	3	3	1	3	3	1	1	1	

TdL (Toro de Lidia)

Table S2. Multi-locus composition of the haplotypes defined in this study, and correspondence to the nomenclature of previously published Y-chromosome data by Pelayo *et al.* (2015) and Edwards *et al.* (2011).

Haplotype	BM 861	BYM 1	INRA 189	UMN 0103	UMN 0307	ZFY 10	UTY 19	USP9Y	Pelayo <i>et al.</i> (2015)	Edwards <i>et al.</i> (2011)
Y1H1	156	252	152	122	151	-	C	471	Y1H1	Y1-94-158
Y1H2	156	252	156	122	151	-	C	471	Y1H2	Y1-98-158
N. O.	156	254	156	120	151	-			Y1H3	Y1-98-158
Y1H4	156	254	156	122	155	-	C	471	Y1H4	Y1-98-158
Y1H5	156	254	156	122	151	-	C	471	Y1H5	Y1-98-158
N. O.	156	254	156	122	157	-			Y1H6	Y1-98-158
N. O.	156	254	158	122	155	-			Y1H7	Y1-100-158
N. O.	156	256	154	122	157	-			Y1H8	Y1-96-158
Y1.2H1	156	256	156	112	151	-	C	552	Y1H9	Y1-98-158
N. O.	156	256	156	116	151	-			Y1H10	Y1-98-158
Y1.2H2	156	256	156	122	151	-	C	552	Y1H11	Y1-98-158
Y1H12	156	254	158	122	151	-	C	471	N. O.	Y1-100-158
N. O.	156	250	160	126	151	GT			Y2H1	Y2-102-158
N. O.	156	250	160	130	149	GT			Y2H2	Y2-102-158
N. O.	156	252	148	122	151	GT			Y2H3	Y2-90-158
N. O.	156	252	148	128	151	GT			Y2H4	Y2-90-158
N. O.	156	252	158	128	151	GT			Y2H5	Y2-100-158
N. O.	156	252	160	126	151	GT			Y2H6	Y2-102-158
N. O.	156	252	160	130	149	GT			Y2H7	Y2-102-158
N. O.	156	252	162	132	149	GT			Y2H8	Y2-104-158
N. O.	156	252	164	128	151	GT			Y2H9	Y2-106-158
N. O.	156	254	148	122	151	GT			Y2H10	Y2-90-158
N. O.	156	254	152	130	149	GT			Y2H11	Y2-94-158
Y2H12	156	254	156	130	149	GT	A	552	Y2H12	Y2-98-158
N. O.	156	254	158	130	149	GT			Y2H13	Y2-100-158
N. O.	156	254	158	132	149	GT			Y2H14	Y2-100-158
N. O.	156	254	158	134	149	GT			Y2H15	Y2-100-158
N. O.	156	254	160	128	149	GT			Y2H16	Y2-102-158
Y2H17	156	254	160	130	149	GT	A	552	Y2H17	Y2-102-158
Y2H18	156	254	162	130	149	GT	A	552	Y2H18	Y2-104-158
Y2H19	156	254	162	130	135	GT	A	552	Y2H19	Y2-104-158
Y2H20	156	254	162	132	149	GT	A	552	Y2H20	Y2-104-158
Y2H21	156	254	164	130	149	GT	A	552	Y2H21	Y2-106-158
Y2H22	156	256	160	130	149	GT	A	552	Y2H22	Y2-102-158
N. O.	156	256	162	130	149	GT			Y2H23	Y2-104-158
N. O.	156	256	164	130	151	GT			Y2H24	Y2-106-158
Y2H25	158	254	160	130	149	GT	A	552	Y2H25	Y2-102-160
N. O.	156	252	166	128	151	GT			Y2H26	N.O
Y2H27	156	254	160	130	147	GT	A	552	Y2H27	Y2-102-158
Y2H28	156	254	160	132	149	GT	A	552	N. O.	Y2-102-158
Y2H29	156	254	160	138	149	GT	A	552	N. O.	Y2-102-158
Y2H30	156	254	162	124	135	GT	A	552	N. O.	Y2-104-158
Y2H31	158	254	162	130	149	GT	A	552	N. O.	Y2-104-160

N. O. – NOT OBSERVED



Table S3. Position of the four additional Y chromosome SNPs from the BovineHD BeadChip (Illumina, San Diego, CA and primers) used in this study.

Btau_4_6.1 Position	refSNP*	SNP**	PCR Primer 1	PCR Primer 2	Extension Primer
2,916,801	rs121919254	T/C	ACGTTGGATGAGTTTCCACGACCACTTG	ACGTTGGATGCAGACTCTGTTACAAGACCC	ttatAAGACCCACCAAAAAATA
3,645,679	rs121919281	A/G	ACGTTGGATGTCCATCCTCTGCACCTCAAG	ACGTTGGATGATGAGGTGATGGGAAGTTGG	GCAAAAAACCTTTGGTCC
42,639,036	rs121919323	A/C	ACGTTGGATGTTCTCTAGTCTCATGACAGG	ACGTTGGATGAGATGTCAGAAGCAATGGGC	AGATTGATTGCTAAAGTGAAATG
42,872,361	rs137049553	C/T	ACGTTGGATGACAAGAGTACTACAAACCAC	ACGTTGGATGGGCAATTGTTATGTCTTCGTC	ccTAATCCTTTGATCATTATGTAGT

\*SNPs correspond to BovineHD310000-0103, -0210, -1409 and -1443, respectively. \*\* SNPs are marked according to reference sequence (SourceSeq in Illumina manifest)

Table S4. Combinations of SNP and indel genotypes that define each haplogroup.

Haplogroup	<i>ZFY10</i>	<i>UTY19</i>	<i>USP9Y</i>	rs121919254	rs121 919281	rs121919323	rs137049553
Y1	-	C	471	T	A	A	C
Y1.2	-	C	552	T	G	A	C
Y2	GT	A	552	T	G	A	C
Y3	GT	A	552	C	G	C	T

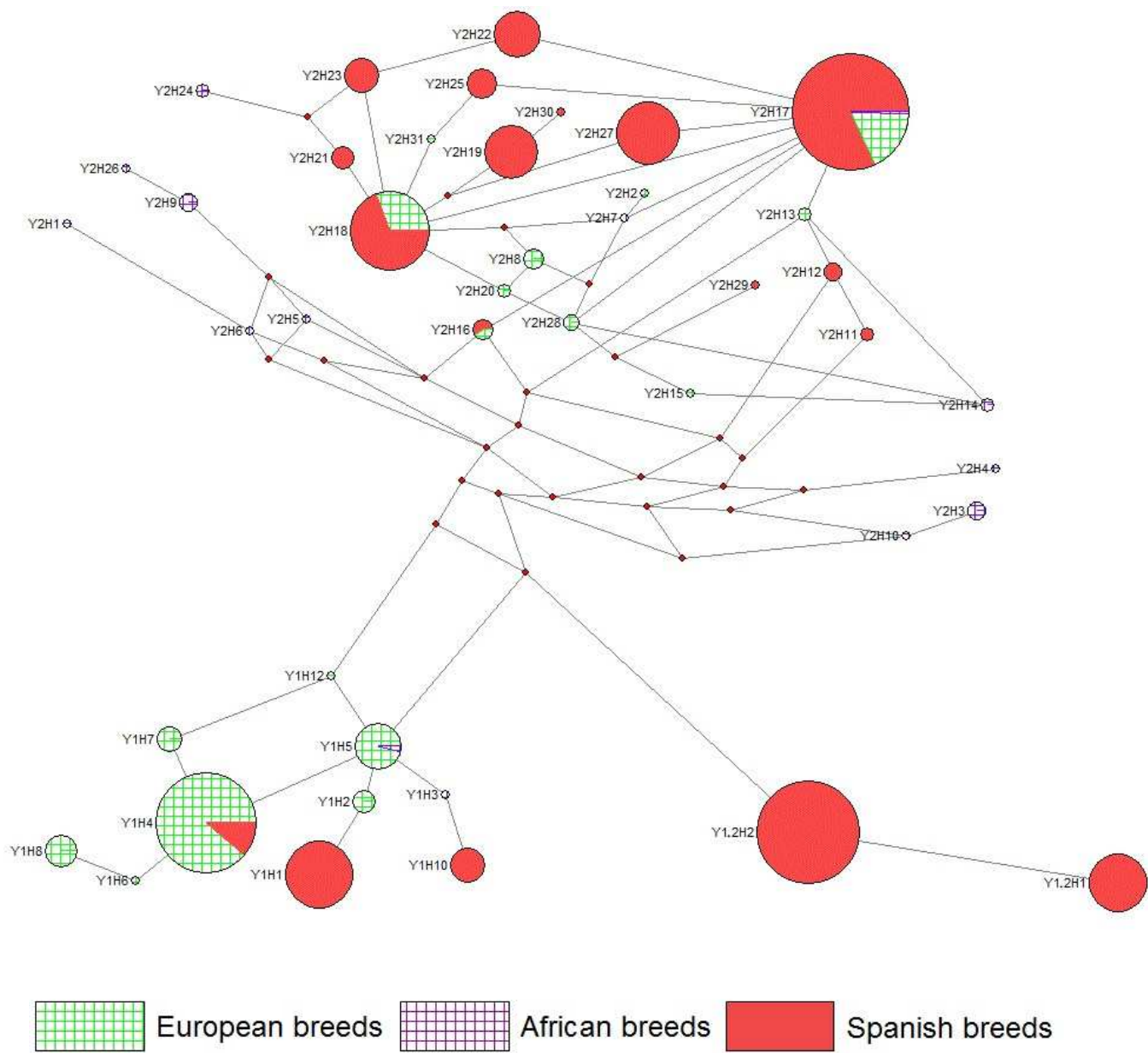
For Peer Review

Table S5. List of markers assigned to the Y-chromosome on the BovineHD BeadChip (Illumina, San Diego, CA) screened for this study.

IlmnID	Name	SNP	AddressA_ID
BovineHD3100001423-1_T_R_1763499304	BovineHD3100001423	[C/G]	10603357
BovineHD3100000352-1_T_R_1763498234	BovineHD3100000352	[A/C]	10670500
BovineHD3100000014-1_T_R_1763497912	BovineHD3100000014	[A/G]	10801301
BovineHD3100001113-1_T_F_1763498983	BovineHD3100001113	[A/G]	11611457
BovineHD3100001220-1_B_R_1764926698	BovineHD3100001220	[T/C]	11612411
BovineHD3100001079-1_T_R_1763498952	BovineHD3100001079	[A/G]	11654428
BovineHD3100000374-1_T_R_1763498260	BovineHD3100000374	[A/C]	11733469
BovineHD3100002060-1_T_R_1763499964	BovineHD3100002060	[A/G]	11744318
BovineHD3100001913-1_T_F_1763499805	BovineHD3100001913	[A/C]	12626438
BovineHD3100001305-1_B_R_1764926778	BovineHD3100001305	[T/G]	12715471
BovineHD3100000167-1_B_R_1764925632	BovineHD3100000167	[T/G]	12722366
BovineHD3100002128-1_B_F_1764927575	BovineHD3100002128	[T/G]	12731437
BovineHD3100000722-1_B_F_1764926153	BovineHD3100000722	[G/C]	12789453
BovineHD3100000079-1_T_F_1763497973	BovineHD3100000079	[A/G]	12793402
BovineHD3100001926-1_B_F_1764927377	BovineHD3100001926	[T/G]	13807469
BovineHD3100000983-1_B_F_1764926437	BovineHD3100000983	[T/C]	18732383
BovineHD3100001409-1_B_R_1764926880	BovineHD3100001409	[T/G]	18791406
BovineHD3100000320-1_B_F_1764925793	BovineHD3100000320	[T/C]	19716363
BovineHD3100000185-1_B_R_1764925644	BovineHD3100000185	[G/C]	19800378
BovineHD3100000817-1_B_R_1764926246	BovineHD3100000817	[T/C]	26600420
BovineHD3100000671-1_T_F_1763498589	BovineHD3100000671	[A/G]	28747465
BovineHD3100001131-1_T_R_1763499006	BovineHD3100001131	[A/C]	28750452
BovineHD3100000868-1_B_F_1764926307	BovineHD3100000868	[T/C]	28758506
BovineHD3100000519-1_T_F_1763498423	BovineHD3100000519	[A/C]	28768429
BovineHD3100000519-1_T_F_1763498423	BovineHD3100000519	[A/C]	28768429
BovineHD3100000542-1_B_F_1764925981	BovineHD3100000542	[T/C]	28790300
BovineHD3100000960-1_T_F_1763498855	BovineHD3100000960	[A/G]	28792509
BovineHD3100000673-1_B_R_1764926102	BovineHD3100000673	[T/C]	28806402
BovineHD3100001762-1_T_F_1763499637	BovineHD3100001762	[A/G]	29600438
BovineHD3100000502-1_T_R_1763498402	BovineHD3100000502	[A/G]	29614429
BovineHD3100001288-1_T_F_1763499159	BovineHD3100001288	[A/C]	29682428
BovineHD3100001030-1_B_R_1764926490	BovineHD3100001030	[T/C]	29682491
BovineHD3100000022-1_T_R_1763497922	BovineHD3100000022	[C/G]	29689427
BovineHD3100000551-1_B_R_1764925988	BovineHD3100000551	[T/C]	29698461
BovineHD3100000223-1_T_F_1763498107	BovineHD3100000223	[A/G]	29704388
BovineHD3100001041-1_T_F_1763498921	BovineHD3100001041	[A/G]	29794363
BovineHD3100002095-1_B_F_1764927533	BovineHD3100002095	[T/C]	44715357
BovineHD3100001248-1_T_F_1763499115	BovineHD3100001248	[A/G]	44721378
BovineHD3100000888-1_B_F_1764926335	BovineHD3100000888	[T/C]	44723419
BovineHD3100000872-1_B_R_1764926316	BovineHD3100000872	[T/A]	44731317
BovineHD3100000226-1_B_R_1764925690	BovineHD3100000226	[T/G]	44732384
BovineHD3100001895-1_T_F_1763499787	BovineHD3100001895	[C/G]	44732507
BovineHD3100000639-1_T_F_1763498551	BovineHD3100000639	[C/G]	44745342
BovineHD3100000387-1_T_F_1763498281	BovineHD3100000387	[A/C]	44751497
BovineHD3100001349-1_B_F_1764926825	BovineHD3100001349	[T/C]	44806420
BovineHD3100000968-1_B_R_1764926424	BovineHD3100000968	[T/C]	46650417
BovineHD3100000198-1_B_R_1764925658	BovineHD3100000198	[T/G]	46687501
BovineHD3100000809-1_B_R_1764926234	BovineHD3100000809	[T/C]	46708362
BovineHD3100001503-1_B_F_1764926957	BovineHD3100001503	[T/C]	47733474
BovineHD3100000192-1_B_R_1764925648	BovineHD3100000192	[T/C]	47787405
BovineHD3100000192-1_B_R_1764925648	BovineHD3100000192	[T/C]	47787405
BovineHD3100000072-1_B_F_1764925525	BovineHD3100000072	[T/G]	47803429
BovineHD3100000012-1_T_F_1763497907	BovineHD3100000012	[A/G]	47804463
BovineHD3100000737-1_T_R_1763498652	BovineHD3100000737	[A/C]	47807425
BovineHD3100000687-1_B_F_1764926117	BovineHD3100000687	[T/G]	48611492

1	BovineHD3100002086-1_T_F_1763499995	BovineHD3100002086	[A/G]	48619466
2	BovineHD3100001500-1_T_F_1763499391	BovineHD3100001500	[A/G]	48690491
3	BovineHD3100000806-1_T_R_1763498728	BovineHD3100000806	[A/C]	48735308
4	BovineHD3100000911-1_T_R_1763498806	BovineHD3100000911	[A/G]	48738345
5	BovineHD3100001017-1_T_R_1763498906	BovineHD3100001017	[A/T]	48747464
6	BovineHD3100002079-1_T_F_1763499987	BovineHD3100002079	[A/C]	48749304
7	BovineHD3100000726-1_T_F_1763498639	BovineHD3100000726	[A/C]	48755397
8	BovineHD3100000507-1_T_F_1763498409	BovineHD3100000507	[A/C]	48759369
9	BovineHD3100000435-1_B_R_1764925888	BovineHD3100000435	[T/A]	48760502
10	BovineHD3100001640-1_T_R_1763499518	BovineHD3100001640	[A/C]	48764305
11	BovineHD3100001933-1_B_F_1764927387	BovineHD3100001933	[T/G]	49800504
12	BovineHD3100000093-1_B_F_1764925541	BovineHD3100000093	[T/G]	50765456
13	BovineHD3100000316-1_B_F_1764925785	BovineHD3100000316	[T/G]	50767306
14	BovineHD3100001360-1_B_F_1764926835	BovineHD3100001360	[T/G]	50788383
15	BovineHD3100001696-1_T_F_1763499575	BovineHD3100001696	[A/G]	50793320
16	BovineHD3100000037-1_T_R_1763497934	BovineHD3100000037	[A/G]	50794335
17	BovineHD3100001700-1_T_F_1763499577	BovineHD3100001700	[A/G]	51612454
18	BovineHD3100000785-1_B_R_1764926216	BovineHD3100000785	[T/G]	53766401
19	ARS-BFGL-NGS-106614-0_B_R_1511679470	ARS-BFGL-NGS-106614	[T/G]	53798389
20	BovineHD3100001607-1_T_F_1763499491	BovineHD3100001607	[A/G]	54656463
21	BovineHD3100001157-1_T_F_1763499035	BovineHD3100001157	[A/G]	54723384
22	BovineHD3100000907-1_T_F_1763498803	BovineHD3100000907	[A/C]	56655483
23	BovineHD3100000907-1_T_F_1763498803	BovineHD3100000907	[A/C]	56655483
24	BovineHD3100001858-1_T_R_1763499746	BovineHD3100001858	[A/G]	56658468
25	BovineHD3100000318-1_B_F_1764925789	BovineHD3100000318	[T/C]	56666360
26	BovineHD3100001575-1_B_F_1764927037	BovineHD3100001575	[T/C]	56684337
27	BovineHD3100001635-1_B_R_1764927102	BovineHD3100001635	[T/C]	56809359
28	BovineHD3100000511-1_B_F_1764925953	BovineHD3100000511	[G/C]	57602328
29	BovineHD3100000415-1_B_F_1764925867	BovineHD3100000415	[T/C]	57606381
30	BovineHD3100001426-1_T_F_1763499309	BovineHD3100001426	[A/G]	60644502
31	BovineHD3100000317-1_B_R_1764925788	BovineHD3100000317	[T/C]	60648418
32	BovineHD3100001414-1_B_F_1764926883	BovineHD3100001414	[T/C]	60649407
33	BovineHD3100001057-1_T_R_1763498936	BovineHD3100001057	[A/G]	60653411
34	BovineHD3100000667-1_B_R_1764926096	BovineHD3100000667	[T/G]	60653416
35	BovineHD3100001301-1_B_F_1764926773	BovineHD3100001301	[T/G]	61626404
36	BovineHD3100000611-1_T_F_1763498521	BovineHD3100000611	[C/G]	71688490
37	BovineHD3100001443-1_B_F_1764926903	BovineHD3100001443	[T/C]	74746425
38	BovineHD3100001188-1_T_F_1763499061	BovineHD3100001188	[A/C]	12783473
39	BovineHD3100000103-1_B_F_1764925557	BovineHD3100000103	[T/C]	52771338
40	BovineHD3100000517-1_B_F_1764925957	BovineHD3100000517	[T/C]	18793427
41	BovineHD3100001406-1_B_F_1764926875	BovineHD3100001406	[T/C]	16693444
42	BovineHD3100000515-1_T_R_1763498420	BovineHD3100000515	[C/G]	50649502
43	BovineHD3100001404-1_T_R_1763499280	BovineHD3100001404	[A/G]	33641309
44	BovineHD3100000048-1_B_R_1764925498	BovineHD3100000048	[T/C]	58795329
45	BovineHD3100000099-1_B_R_1764925550	BovineHD3100000099	[G/C]	62627467
46	BovineHD3100000210-1_B_R_1764925670	BovineHD3100000210	[T/C]	23603414
47				
48				
49				
50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				

Figure S1. Network constructed with Y chromosome haplotype data based on the eight markers defined in Table S2 from 1507 animals (1300 samples from Pelayo et al. (2015) and 207 samples from this study). Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and geographic breed groups are colour coded.



### 3.2 CAPÍTULO II: CALIFICACIÓN LINEAL ESTANDARIZADA PARA EL COMPORTAMIENTO EN LA RAZA DE LIDIA Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS

Este segundo capítulo está constituido por un artículo científico:

- Pelayo R, Solé M, Sánchez M.J, Molina A, Valera M. 2016. Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters. Journal of Animal Breeding and Genetics, 133(2016): 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198.

#### RESUMEN

En el capítulo II de la presente Tesis Doctoral se presenta un análisis en profundidad sobre la evaluación del comportamiento en la raza bovina de lidia.

Se sabe que la docilidad es muy importante para la producción del ganado y muchas pruebas se han desarrollado para la medición de este rasgo. Sin embargo, muy pocos estudios objetivos se han llevado a cabo para medir el enfoque opuesto, es decir, el comportamiento “agresivo” o bravo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue validar, en la raza de Lidia, un sistema de “Calificación Lineal Estandarizado para el Comportamiento” (CLEC) que pudiera medir de una forma más objetiva la conducta “agresiva” o “bravura” del toro de Lidia y además permitiese un posterior análisis genético de los rasgos comportamentales de interés en esta raza (bravura o agresividad, movilidad y fuerza).

En el estudio se calcularon medidas de repetibilidad y reproducibilidad para las 12 variables de este sistema de calificación. La repetibilidad osciló entre el 66,7% para la variable *momento de fatiga en la muleta* y el 97,9% para la variable *prontitud en la muleta* y la reproducibilidad osciló entre el 85,3% para la variable *número de caídas en la muleta* y el 94,2% para la variable *recorrido en la muleta*.

Posteriormente se estimaron los parámetros genéticos utilizando un modelo animal con un enfoque bayesiano. En este modelo se incluyeron como efectos fijos: el sexo (macho o hembra), la categoría del torero (escuela, novillero sin picador, novillero con picador y matador) y un efecto fijo concatenado que incluye la ganadería, la condición corporal del animal y la

fecha de evaluación. Se analizaron un total de 1202 registros comportamentales y un pedigrí de 5001 animales. Los resultados aportaron heredabilidades (y desviaciones estándar) que oscilaron entre 0,13 (0,04) para la variable *número de caídas en la muleta* y 0,41 (0,08) para la variable *prontitud en caballo*. Las correlaciones genéticas oscilaron entre 0,01 (0,07) entre las variables *distancia de arrancada en el caballo* y *humillado en el caballo* a 0,90 (0,13) entre las variables *fijeza en la muleta* y *prontitud en la muleta*. Destacar que el 93,9 % de las correlaciones genéticas fueron positivas.

Por último, se realizó un análisis de componentes principales y todas las variables de la ficha CLEC se agruparon en 3 factores que describieron los 3 índices genéticos de interés: agresividad o bravura, fuerza y movilidad.

En conclusión, los resultados de este estudio reportaron heredabilidades para los caracteres comportamentales de interés en la raza de Lidia de acuerdo con los valores ya hallados en estudios anteriores donde los datos comportamentales se registraron con otros métodos. Además, este estudio ha proporcionado un sistema de puntuación lineal estandarizado que es reproducible entre diferentes calificadores y considerando animales de diferentes ganaderías, que mejorará sustancialmente la correcta evaluación de los rasgos comportamentales en la raza bovina de Lidia.

### **3.2.1 ARTÍCULO 3 (CAPÍTULO II). BEHAVIOURAL LINEAR STANDARDIZED SCORING SYSTEM OF THE LIDIA CATTLE BREED BY TESTING IN HERD: ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS**

Título (en español): SISTEMA DE PUNTUACIÓN LINEAL ESTANDARIZADO DEL COMPORTAMIENTO EN LA RAZA DE LIDIA TESTADO EN GANADERIAS: ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS

Authors: **Pelayo R<sup>1</sup>**, Solé M<sup>1</sup>, Sánchez M.J<sup>1</sup>, Molina A<sup>2</sup> and Valera M<sup>1</sup>

Affiliations: <sup>1</sup>Departamento de Ciencias Agro-Forestales, ETSIA, Universidad de Sevilla, Ctra. Utrera km 1, 41013-Sevilla, España; <sup>2</sup>Departamento de Genetica, Facultad de Veterinaria, UCO, Ctra. Madrid-Cádiz (N-IV) Km.396<sup>a</sup>, 14071-Córdoba, España.

Publication: **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 133(2016): 414-421. Doi: **10.1111/jbg.12198**

- Impact Index: 1,779 (Journal Citation Report, 2015).
- Subject and Quartile: Genetics and heredity, 1st quartile.







ORIGINAL ARTICLE

# Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters

R. Pelayo<sup>1</sup>, M. Solé<sup>1</sup>, M.J. Sánchez<sup>1</sup>, A. Molina<sup>2</sup> & M. Valera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department Ciencias Agro-Forestales, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Department Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

## Keywords

Behavioural fighting ability; bovine; fearless; linear scoring system.

## Correspondence

R. Pelayo García, Departamento de Ciencias Agro-forestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad de Sevilla. Carretera de Utrera Km 1., Sevilla, Spain.  
Tel: +34954487748;  
Fax: +34954486436;  
E-mail: v22pegar@uco.es

Received: 4 February 2015;  
accepted: 10 November 2015

## Summary

Docility is very important for cattle production, and many behavioural tests to measure this trait have been developed. However, very few objective behavioural tests to measure the opposite approach 'aggressive behaviour' have been described. Therefore, the aim of this work was to validate in the Lidia cattle breed a behavioural linear standardized scoring system that measure the aggressiveness and enable genetic analysis of behavioural traits expressing fearless and fighting ability. Reproducibility and repeatability measures were calculated for the 12 linear traits of this scoring system to assess its accuracy, and ranged from 85.3 and 94.2%, and from 66.7 to 97.9%, respectively. Genetic parameters were estimated using an animal model with a Bayesian approach. A total of 1202 behavioural records were used. The pedigree matrix contained 5001 individuals. Heritability values (with standard deviations) ranged between 0.13 (0.04) (Falls of the bull) and 0.41 (0.08) (Speed of approach to horse). Genetic correlations varied from 0.01 (0.07) to 0.90 (0.13). Finally, an exploratory factor analysis using the genetic correlation matrix was calculated. Three main factors were retained to describe the traditional genetic indexes aggressiveness, strength and mobility.

## Introduction

In beef or dairy cattle, docility is very important for animal welfare reasons, the farmer's and veterinarian's safety as well as for economic reasons (Geburt *et al.* 2015). A docile temperament facilitates the reduction of the stress during handling that provides advantages of increasing productivity and maintaining meat quality (Gebregeziabhear & Ameha 2015). However, in some breeds like the Valdostana breed or the Lidia cattle the selection is carried out by farmers looking for traits in part positively related with an aggressive behaviour (Silva *et al.* 2006; Sartori *et al.* 2014). The Lidia is an autochthonous breed raised in several countries in Europe and America. In Spain it is exploited on a traditional extensive agro-forestry system called 'dehesa'. The high rusticity of the Lidia

cattle breed enables the optimal use of almost all natural resource available on this system. The breed is characterized by strong physical appearance, an impressive strength and a natural aggressiveness, that are appropriate qualities for bullfighting. The Lidia cattle breed has been traditionally selected for fearlessness since the XV century (Lomillos *et al.* 2013), which takes into account aggressiveness, strength and mobility. This type of selection favoured its reproductive isolation from the rest of the domestic bovine populations, where this characteristic was not desirable (Cortés *et al.* 2011).

The traditional system that breeders use to evaluate fearlessness behaviour is the test called 'tienta' and performed within the farm where the animals are reared (Domínguez-Viveros *et al.* 2014). The 'tienta' is a complex test to assess the fighting ability when

different behavioural characteristics are scored on young animals that have not yet achieved their full strength. This system suffers from the complexity of interpreting the results and for a subjectivity of the appraisers; each farmer has his own scoring system to assess the bravery of the animal. Likewise, each farmer decides the test length because several bullfighters could participate in it thus increasing the degree of stress in the animal. Fighting ability has also been investigated in others breeds used for bullfighting and selected for aggressiveness like Hérens or Valdostana cattle (Sartori & Mantovani 2010).

The breeding programme for the Lidia cattle breed was approved in 2011 (<http://www.magrama.es>). As a primary purpose, the development of an objective system for testing the behavioural performance of the future breeding stock is commonly cited. The objective system is based on a linear scoring which has been designed to evaluate individual traits on a linear scale, including all the variability in the population (Samoré *et al.* 1997). This type of methodology will be useful in understanding the genetic background that characterizes the complexity of behavioural traits and to fulfil the breeding programme objective. For the time being, the degree of docility is evaluated by the majority of published behaviour tests (Gauly *et al.* 2001; Adamczyk *et al.* 2013). However, the behavioural test of this study could be used in other cattle breeds keeping in mind that it has been designed for the evaluation of aggressive behaviour.

Therefore, the aims of this present study are (i) to validate the system proposed for behavioural fighting ability based on a linear scale scoring system being more objective and less stressful to animals than traditional systems, (ii) to carry out a genetic analysis for the different behavioural traits measured, (iii) to perform an exploratory factor analysis to define the genetic indices which could be used for future selection of the breeding stock.

## Materials and methods

### Animals and data

The database used for this study included a total of 1202 behavioural records, collected between 2008 and 2013, from 22 different herds during the behavioural test of the animals performed on the farm. The records were from 368 males and 834 females, rated when they were 2 or 3 years old (average age:  $2.11 \pm 0.01$  years). All the animals recorded during the behavioural test were selected for future breeding purposes only, and none of these animals were involved in bull festivals.

Behavioural assessment was based on a linear standardized evaluation system previously described by Valera *et al.* (2010), which included a total of 12 different traits, and reported in Table S1 with the relative abbreviation and definition. Five behavioural traits regarding the bull attitude 'towards the horse', also called 'Section of the horse', analyse the behaviour of the bull towards the horse rider. The horse was dressed with a strong blanket for its protection to prevent any kind of injury. This section included the following traits: Start distance to horse (SD\_HOR), Speed of approach to horse (SA\_HOR), Speed of charging to horse (SP\_HOR), Humiliate to horse (HU\_HOR) and Fight with the horse (FIG\_HOR). Other five traits considered the bull attitude 'against the lure' (without horse), which analysed the behaviour of the bull against bullfighter assessing the movements of both (humiliate to bullfighter, speed of charging etc.). Traits of this section were Fixed attention to lure (FIX\_LUR), Speed of approach to bullfighter (SA\_LUR), Speed of charging to lure (SP\_LUR), Humiliate to bullfighter (HU\_LUR) and Distance covered by the bull (DI\_LUR). Finally, the third part included two general traits also evaluating whether the bulls has shown fatigue or not (Fatigue moment, FAT\_LUR), and the number of falls the bulls had during the performance (Falls of the bull, FAL\_LUR). Each trait was divided into five or six possible classes corresponding to the minimum and maximum biological expression of the trait. These traits were a summary of the items that were traditionally evaluated by breeders and had an economic relevance in the Lidia cattle breeding programme. The test length ranged from 13 to 19 min and a single bullfighter participated in each behavioural test.

The behavioural test performed during the traditional testing procedure ('tienta') was held according to the animal welfare standards contained in the Royal Decree 348/2000 by which it is incorporated into the legal system Directive 98/58/EC concerning the protection of animals kept for farming purposes (BOE 61, March 11, 2000).

### Statistical and genetic model

#### *Evaluation of the proposed scoring system*

A trial by a total of 59 appraisers and six bulls was carried out to assess the methodology. All the animals were evaluated by all the appraisers, and each appraiser repeated the evaluation of the six bulls by video recording after the behavioural test; all bulls were recorded for this purpose.

The evaluation of the system and appraisers was carried out by taking into account the following parameters:

- Reproducibility: the probability that two different appraisers scored the same appraisal for the same trait and the same bull. This was estimated as an intraclass correlation between bulls measured by more than one appraiser (Sánchez *et al.* 2013).
- Repeatability: the probability of awarding the same scoring on the same trait for the same bull in two evaluations by the same appraiser (Sánchez *et al.* 2013). The repeated evaluations of the appraisers were used to calculate this parameter.

These parameters were evaluated by all the 59 initial appraisers. Finally, the 22 best appraisers with the highest reproducibility and repeatability parameters (overall average values over 90%) were selected for the evaluation of the 1202 animals used to estimate the genetic parameters.

#### Genetic parameter estimation

For the genetic analysis, pedigree information was collected from the Lidia cattle breed official stud-book (AEGRB (<http://www.resesbravas.com/>)). All known generations were used making a total coancestry matrix of 5001 individuals. Moreover, the heritabilities and genetic correlations were estimated using an animal model following a Bayesian approach with Gibbs2f90 and postgibbsf90 programs of the BLUPF90 family (Misztal *et al.* 2002). Given the distribution of some traits does not follow a normal distribution the Bayesian approach was used as this does not need any assumption about the distribution of data. Multinomial threshold model was not used because the scales of the different traits are defined by its linear nature.

The data preparation was carried out with the renuf90 program by the same authors. A single chain of 200 000 samples was run, with the first 50 000 samples discarded as burn-in. Posterior mean and standard deviation (SD) were calculate for each parameter. The analysis included all the 12 traits reported in Table S1, following the model:

$$Y_{ijklm} = \text{HBD}_i + \text{SEX}_j + \text{BC}_k + a_m + e_{ijklm}$$

where:  $Y_{ijklm}$  is the analysed linear trait;  $\text{HBD}_i$  is the fixed combination effect of the herd, the body condition categorical score of the animal and the evaluation date ( $i = 1-93$ );  $\text{SEX}_j$  is the fixed effect of the sex ( $j = \text{male or female}$ );  $\text{BC}_k$  is the fixed effect of the bullfighter category ( $k = 1-4$ ; where 1 = amateur, 2 = apprentice with <2 years' experience, 3 =

apprentice with more than 2 years' experience and 4 = professional);  $a_m$  is the random additive genetic effect of the animal ( $m = 1-1202$ ) and  $e_{ijklm}$  is the random residual effect. Posterior mean and SD of genetic parameters were calculated using the Gibbs samples obtained after Bayesian analysis.

An exploratory factor analysis (EFA) (Larsen & Warne 2010) was carried out using the obtained genetic correlation matrix with a varimax rotation strategy, in order to find the most suitable trait combination to create the genetic indices. The proposed indices were defined according to the traditional criteria of selection in the Lidia cattle breed: aggressiveness (fighting ability or wildness), strength (the ability to attack with strength using the whole body) and mobility (the animal is in continuous movement pacing from one place to another) (Pelayo *et al.* 2014). These genetic indexes are aimed to be included in selection routine with the same economic weights currently used for the traditional traits. The main aim of the EFA is to simplify the number of observed variables into a smaller number of latent variables (called factors) that account for most of the variance of the original observed variables (Larsen & Warne 2010). A threshold of an eigenvalue higher than one was chosen as criterion to select the latent variables to be retained.

Finally, canonical correlations coefficients between indices were obtained based on the genetic correlation matrix among the 12 traits selected after the previous analysis in this study. A sequential testing procedure for the significance of canonical correlations was used (Mendoza *et al.* 1978). Specifically, this module enabled us to investigate the relationship between the set of variables included in each index. All the statistical analyses were carried out using the Statistica software 8.0 (Statsoft, Inc., 2007).

## Results

Table 1 shows the analysis of the reproducibility and repeatability of the appraisers' evaluation. All the values obtained were high and over 65%. The reproducibility ranged between 85.3% (FAL\_LUR) and 94.2% (DI\_LUR), and the repeatability varied from 66.7% (FAT\_LUR) to 97.9% (SA\_LUR).

The descriptive statistics of the analysed behavioural linear type traits are also shown in Table 1. All the classes provided for each trait were used, except FAL\_LUR, in which the range of the classes used varied between 2 and 5 (none of the animals tested were classified in Class 1, 'animals disqualified').

**Table 1** Reproducibility and Repeatability of the behavioural linear standardized scoring system (n = 59 appraisers for five bulls video recording) and descriptive statistics of the behavioural linear type traits analysed in the Lidia cattle breed

Trait	Reproducibility average (%)	Repeatability average (%)	Mean $\pm$ SE	Mode	Range	CV (%) <sup>1</sup>
Section of the horse						
Start distance to horse	91.7	85.0	3.39 $\pm$ 0.04	4	1–5	36.59
Speed of approach to horse	88.4	82.9	3.24 $\pm$ 0.03	3	1–5	32.93
Speed of charging to horse	87.3	84.0	3.39 $\pm$ 0.03	4	1–5	30.69
Humiliate to horse	89.4	87.0	3.63 $\pm$ 0.03	4	1–5	25.12
Fight with the horse	88.1	83.8	3.28 $\pm$ 0.03	3	1–5	34.51
Section of the lure						
Fixed attention to lure	87.9	87.5	3.75 $\pm$ 0.03	4	1–5	30.08
Speed of approach to bullfighter	91.1	97.9	3.57 $\pm$ 0.03	3	1–5	31.67
Speed of charging to lure	92.1	95.8	4.10 $\pm$ 0.03	5	1–5	29.26
Humiliate to bullfighter	91.9	97.2	3.60 $\pm$ 0.03	4	1–5	31.73
Distance covered by the bull	94.2	95.8	3.68 $\pm$ 0.03	4	1–5	31.09
Fatigue moment	91.6	66.7	5.39 $\pm$ 0.03	6	1–6	18.20
Falls of the bull	85.3	80.6	4.63 $\pm$ 0.02	5	2–5	14.77

<sup>1</sup>Coefficient of variation.

The mode statistic showed that the most common class used in this population was the central (3 or 4) for the section of the horse, from 3 to 5 for the section of the lure and from 5 to 6 for the general traits. The analysed behavioural traits 'towards the horse' showed a high coefficient of variation, >25% (ranging from 25.1% (HU\_HOR) to 36.6% (SD\_HOR). Behavioural traits 'against the lure' also showed high variability with a CV around 30%. Finally, general traits (FAT\_LUR and FAL\_LUR) showed less variability (18.2 and 14.8%, respectively).

In general, the estimates obtained for the heritabilities were of moderate magnitude (Table 2), ranging between 0.13 (SD = 0.04) (FAL\_LUR) to 0.41 (SD = 0.08) (SA\_HOR). The estimated genetic correlations were positive in 93.9% of the cases, ranging from 0.01 (SD = 0.07) (between SD\_HOR-HU\_HOR) and 0.01 (SD = 0.05) (between FIX\_LUR-FAL\_LUR) to 0.90 (SD = 0.13) (between FIX\_LUR-SA\_LUR). The genetic correlations were negative in 6.1% of the cases, ranging from -0.17 (SD = 0.07) (between SA\_HOR-FAT\_LUR) to -0.38 (SD = 0.05) (between SD\_HOR-FAT\_LUR). The highest genetic correlations were found between traits of the same section: 0.89 (SD = 0.11) between HU\_HOR and FIG\_HOR (section of the horse), 0.90 (SD = 0.13) between FIX\_LUR and SA\_LUR (section of the lure) or 0.60 (SD = 0.05) between FAT\_LUR and FAL\_LUR (general traits). The estimates obtained for the phenotypic correlations were of moderate to high (Table 2) except in the general traits, where the phenotypic correlations were low or negative.

Three factors (*aggressiveness index*, *strength index* and *mobility index*) were identified in the exploratory factor analysis of the studied behavioural traits (Table 3). Each index roughly corresponded to each of the three traits evaluated in the traditional selection. These three factors explained more than 88% of the total variance. Accordingly, the first factor (*aggressiveness*) explained 57.8% of total variance while the second (*strength*) explained 16.7% of total variance and 13.9% the third factor (*mobility*). The factor loadings (fl) between the three factors and the analysed traits are given in Table 4. The first factor was an *aggressiveness index* and included the variables SA\_LUR (fl = -0.95), FIG\_HOR (fl = -0.91), DI\_LUR (fl = -0.88), HU\_LUR (fl = -0.86), FIX\_LUR (fl = -0.86), HU\_HOR (-0.86), SP\_LUR (fl = -0.85), SP\_HOR (fl = -0.78) and SA\_HOR (fl = -0.69). The second factor was a *strength index* and included the traits FAT\_LUR (fl = 0.87), FAL\_LUR (fl = 0.74) and SA\_HOR (fl = -0.54). The third factor was a *mobility index* and included the traits SD\_HOR (fl = 0.96), SA\_HOR (fl = -0.40), SP\_HOR (fl = -0.40) and FAL\_LUR (fl = 0.37).

Finally, canonical correlations (cr) between the set of variables of the factors were calculated. The correlations obtained were high and statistically significant ( $p = 0.001$ ) in all the combinations. The highest canonical correlation was found for the aggressiveness versus strength factors combination ( $cr = 0.95$ ). Likewise, the canonical correlations for aggressiveness versus mobility factors, and the strength versus mobility factors combinations were high ( $cr = 0.63$ ) and moderate ( $cr = 0.30$ ), respectively (Table 4).

**Table 2** Heritabilities (diagonal with SD), genetic correlations (above the diagonal with SD) and phenotypic correlations (below the diagonal with SD) between the 12 linear type traits analysed in the Lidia cattle breed

	SD_HOR	SA_HOR	SP_HOR	HU_HOR	FIG_HOR	FIX_LUR	SA_LUR	SP_LUR	HU_LUR	DI_LUR	FAT_LUR	FAL_LUR
SD_HOR <sup>1</sup>	<b>0.33 (0.04)</b>	0.09 (0.06)	-0.28 (0.05)	0.01 (0.07)	0.51 (0.06)	0.15 (0.06)	0.74 (0.08)	0.57 (0.05)	0.68 (0.05)	0.46 (0.06)	-0.38 (0.05)	0.32 (0.04)
SA_HOR	0.33 (0.03)	<b>0.41 (0.08)</b>	0.5 (0.07)	0.70 (0.1)	0.66 (0.09)	0.82 (0.08)	0.74 (0.14)	0.29 (0.08)	0.49 (0.07)	0.57 (0.09)	-0.17 (0.07)	-0.28 (0.05)
SP_HOR	0.37 (0.03)	0.50 (0.02)	<b>0.36 (0.07)</b>	0.64 (0.08)	0.63 (0.08)	0.60 (0.07)	0.79 (0.12)	0.78 (0.07)	0.52 (0.06)	0.71 (0.08)	0.40 (0.06)	0.41 (0.04)
HU_HOR	0.31 (0.03)	0.48 (0.03)	0.49 (0.03)	<b>0.32 (0.12)</b>	0.89 (0.11)	0.69 (0.11)	0.89 (0.18)	0.61 (0.1)	0.71 (0.09)	0.64 (0.12)	0.34 (0.09)	0.15 (0.06)
FIG_HOR	0.41 (0.03)	0.55 (0.02)	0.53 (0.02)	0.63 (0.02)	<b>0.29 (0.1)</b>	0.71 (0.1)	0.82 (0.14)	0.69 (0.09)	0.8 (0.09)	0.75 (0.11)	0.28 (0.08)	0.20 (0.05)
FIX_LUR	0.34 (0.03)	0.46 (0.03)	0.49 (0.03)	0.47 (0.03)	0.56 (0.02)	<b>0.33 (0.08)</b>	0.90 (0.13)	0.57 (0.08)	0.79 (0.08)	0.81 (0.09)	0.13 (0.07)	0.01 (0.05)
SA_LUR	0.34 (0.03)	0.53 (0.02)	0.48 (0.03)	0.48 (0.03)	0.56 (0.02)	0.69 (0.02)	<b>0.27 (0.08)</b>	0.86 (0.09)	0.58 (0.11)	0.69 (0.14)	0.08 (0.09)	0.20 (0.05)
SP_LUR	0.32 (0.03)	0.36 (0.03)	0.56 (0.02)	0.40 (0.03)	0.47 (0.03)	0.67 (0.02)	0.64 (0.02)	<b>0.32 (0.06)</b>	0.72 (0.06)	0.72 (0.08)	0.58 (0.06)	0.31 (0.04)
HU_LUR	0.27 (0.03)	0.41 (0.03)	0.43 (0.03)	0.47 (0.03)	0.48 (0.03)	0.67 (0.02)	0.66 (0.02)	0.60 (0.02)	<b>0.22 (0.05)</b>	0.85 (0.08)	0.37 (0.05)	0.08 (0.04)
DI_LUR	0.30 (0.03)	0.42 (0.03)	0.48 (0.03)	0.46 (0.03)	0.54 (0.02)	0.78 (0.02)	0.65 (0.02)	0.67 (0.02)	0.70 (0.02)	<b>0.28 (0.09)</b>	0.41 (0.08)	0.17 (0.05)
FAT_LUR	0.06 (0.03)	0.10 (0.03)	0.23 (0.03)	0.16 (0.03)	0.16 (0.03)	0.15 (0.03)	0.27 (0.03)	0.20 (0.03)	0.23 (0.03)	0.21 (0.03)	<b>0.24 (0.08)</b>	0.60 (0.05)
FAL_LUR	0.04 (0.03)	-0.04 (0.03)	0.05 (0.03)	-0.03 (0.03)	-0.03 (0.03)	0.00 (0.03)	0.15 (0.03)	0.03 (0.03)	0.02 (0.03)	-0.02 (0.03)	0.47 (0.03)	<b>0.13 (0.04)</b>

<sup>1</sup>see in Table S1 the meaning of the abbreviations of the traits. Where: SD is standard deviation.**Table 3** Results of exploratory factor analysis for the behavioural traits studied in the Lidia cattle breed

Factors	Eigenvalues	% of the initial variability	Accumulated percentage
1	6.94	57.81	57.81
2	2.00	16.71	74.52
3	1.66	13.86	88.38

## Discussion

Breeders score cattle behaviour by rating different aspects on a numerical scale based on an 'ideal' performance during the behavioural test or during the bullfight. But this classical system has many limitations when applied in a performance testing situation for a breeding programme. If an animal is observed by two different appraisers wide differences in the final qualification may be detected even if those appraisers are experienced (Calero *et al.* 1997). Another problem is that the behavioural test is unrepeatable because animals learn behaviour that invalidates any subsequent test (Silva *et al.* 2006).

Robustness based on behavioural genetic evaluation is difficult because of problems with trait definition and subjectivity of measurement (Adamczyk *et al.* 2013). No evaluation system has been designed to reduce subjectivity in the assessment of the fearlessness and fighting ability for bullfighting and physical performance (Silva *et al.* 2006).

A wide range of methods have been defined for the assessment of behavioural traits in cattle (Adamczyk *et al.* 2013), but a considerable degree of subjectivity still remains. Currently, there is no established scale for assessing the best performance of the Lidia cattle breed, and very few studies have been published using objective approaches looking for aggressive behaviour (Almenara-Barrios & García 2011). Few studies have also been carried out to estimate the genetic parameters of behavioural traits in the Lidia cattle breed (Silva *et al.* 2006; Almenara-Barrios & García 2011; Domínguez-Viveros *et al.* 2014) or other cattle breeds with fearless behaviour like Valdostana breed (Sartori & Mantovani 2010). Additionally, the estimation of the genetic parameters in the Lidia cattle breed was made intraherd only, because they did not have a standardized system.

In a breeding programme it is strongly recommended to change the traditional classification system when based on subjective evaluation. Therefore, research from other authors indicates the usefulness of a standard scale system as predictor of fearlessness in fighting cattle (Almenara-Barrios & García 2011).



**Table 4** Factor loadings between the three factors retained in the exploratory factor analysis and the 12 linear type traits studied and the canonical correlations between the factor combinations in the Lidia cattle breed

Trait	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Index
Section of the horse				
Start distance to horse	−0.434	−0.314	<b>0.959</b>	Mobility
Speed of approach to horse	<b>−0.689</b>	<b>−0.539</b>	<b>−0.397</b>	Aggressiveness/Strength/Mobility
Speed of charging to horse	<b>−0.776</b>	0.336	<b>−0.392</b>	Aggressiveness/Mobility
Humiliate to horse	<b>−0.858</b>	−0.007	−0.306	Aggressiveness
Fight with the horse	<b>−0.912</b>	−0.073	0.056	Aggressiveness
Section of the lure				
Fixed attention to lure	<b>−0.864</b>	−0.248	−0.234	Aggressiveness
Speed of approach to bullfighter	<b>−0.953</b>	−0.195	0.126	Aggressiveness
Speed of charging to lure	<b>−0.852</b>	0.285	0.235	Aggressiveness
Humiliate to bullfighter	<b>−0.864</b>	−0.055	0.215	Aggressiveness
Distance covered by the bull	<b>−0.888</b>	0.035	0.041	Aggressiveness
Fatigue moment	−0.353	<b>0.874</b>	−0.163	Strength
Falls of the bull	−0.248	<b>0.741</b>	<b>0.368</b>	Strength/Mobility
Canonical correlations between factors				
Factor 1		0.949 ( $p = 0.00$ )	0.629 ( $p = 0.00$ )	
Factor 2			0.295 ( $p = 0.00$ )	

Traits with greater load within each factor are highlighted in bold.

Accordingly, in the proposed alternative method of the present study the fearless assessment of the Lidia cattle breed has been based on a linear standardized scoring system previously designed by Valera *et al.* (2010). Therefore, all complex behavioural traits (that cannot be transformed into simple features) considered in the study of Almenara-Barrios & García (2011) have been replaced by more objective traits. Linear type traits describe the biological extremes for a range of characteristics of an animal, and the methodology has been widely used in various species (Janssens & Vandepitte 2004; Sánchez *et al.* 2013). Benefits lie in the way in which traits are analysed, as these are treated individually rather than in combination (Koenen *et al.* 1995). The information collected should be quantifiable, easy to automate and allows statistical analysis of traits such as fearlessness or lack of strength to be carried out. With this information, a simple system of statistical indicators can be constructed which could demonstrate the evolutionary changes that have been occurring in species under selection.

Moreover, the quality of the genetic evaluation depends largely on the validity of data collected and on the quality of the appraisers' scoring (Janssens & Vandepitte 2004; Sánchez *et al.* 2013). In this sense, the reproducibility of the analysed traits gives valuable information because it enables appraisers to assign individual scores selecting among classes that are within the biological scale of the population. The trial carried out for the appraisers of the present study showed that the scoring procedure was suitable in this

breed as high reproducibility values (>85%) were obtained. The high repeatability values obtained for most of traits (>80%) indicated that the measurement or scoring procedure is adequate (Sánchez *et al.* 2013). Only one trait with a repeatability value lower than 80% was found (FAT\_LUR). This trait has more classes (six rather than five), so the source of error could be higher and, maybe, a reduced scale should be proposed to improve a successful scoring for this trait. In this sense, the constructed scale complies with the reliability amongst the criteria of evaluators that are advocated for this approach with high reliability indexes expressed in the results (Almenara-Barrios & García 2011).

Likewise, high values for the coefficient of variation were observed when important phenotypic variation for the analysed traits occurred. This could indicate a high genetic variation and, thus, ensure a sufficiently high selection response using these traits as selection criteria. The use of the full scale for evaluating the traits enabled a more accurate differentiation between animals, thus highlighting differences among them (Vostrý *et al.* 2009). This is because the linear scale included all the variation present in the studied population (Samoré *et al.* 1997). Therefore, the scale proposed in the present study may be considered suitable for the behavioural assessment of the Lidia cattle breed for fighting ability, as it enables to distinguish most of the biological variability observed in the population. The viability criteria (applicability, acceptability and practicality) are also adequate (Almenara-Barrios & García 2011). However, the

training and continuous evaluation of appraisers is highly recommended to maintain an adequate standard for evaluations (Janssens & Vandepitte 2004).

Regarding genetic parameters, not many references involving behavioural genetic studies in Lidia cattle breed are found in the literature. The main problem is the presence of considerable methodology variation for behaviour assessment (Adamczyk *et al.* 2013). Even though, some references could be found for cattle temperament traits with heritability values ranging from low to high. For example, for those cattle breeds mainly selected for docility like the Limousin or Brahman breeds, the heritability value estimates ranged from 0.11 to 0.49 (Benhajali *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2014). Higher heritabilities for temperament traits were also found in German Angus (ranged from 0.0 to 0.61) and Simmental cattle (ranged from 0.0 to 0.59) (Gauly *et al.* 2001).

For breeds selected for behavioural fighting ability, like the Valdostana breed, the heritability value estimates ranged from 0.09 (Sartori & Mantovani 2010) to 0.16 (Mantovani *et al.* 2007). In the Lidia breed (selected for fearlessness) the heritability value estimates ranged from 0.19 (González *et al.* 1994) to 0.27 (Calero & Durán 2007). Higher heritabilities (from 0.29 to 0.36 for mobility and aggressiveness, respectively) were found by Silva *et al.* (2006). In this context, the obtained heritabilities (0.13–0.41) for the traits analysed in the present study were consistent with those of other authors excluding the value of some traits such as SA\_HOR that was higher.

Understanding the relationship between behavioural traits is extremely informative for the correct procedure of a breeding programme and for the development of selection strategies by defining the correct selection criteria. As it is, the majority of the genetic correlations obtained in the present study were high and positive, in agreement with those found by other authors for similar traits (aggressiveness, ferocity, fixedness, mobility etc.) (Silva *et al.* 2002, 2006). Most of the highest correlations were found between variables belonging to the same section, for example 0.89 between HU\_HOR and FIG\_HOR or 0.90 between FIX\_LUR and SA\_LUR. Therefore, there is a greater correlation between patterns that define the same attitude than patterns of different sections (Sánchez *et al.* 1990). Only the traits SD\_HOR with SP\_HOR and FAT\_LUR or SA\_HOR with FAT\_LUR and FAL\_LUR have negative genetic correlation values, the same as reported previously by Silva *et al.* (2002) for similar traits: for example the genetic correlation between Falling and Ferocity was also negative (−0.51). From the results of the present study, it could be interpreted

as a lack of strength of the bull (more falls and fatigue early) when covering short distances and a long time is requested from the bull to start charging.

To achieve the maximum genetic response by selecting the studied traits, three genetic indices have been proposed using the EFA, according to the criteria of selection in the Lidia cattle breed. Thus, the first factor included nine variables belonging to both sections considered and was related with aggressiveness (considered as the mirroring behaviour of the bull when charges). This factor is in concordance with the traits defined in the synthetic component associated with aggressiveness reported by Almenara-Barrios & García (2011). The second factor included only three traits, and it was related to strength with its relationship to the ability of the bull to resist during the bullfight. In the same manner, the last factor of mobility included those traits related with movement. The percentage of variance which explained 84% of the total variance, is higher than those obtained in the Lidia cattle breed by Sánchez *et al.* (1990) in similar analysis, in which six principal components grouped only the 63.3% of the total variance of the study; in this case, a linear standardized system as proposed in the present work was not used.

Finally, the canonical correlations found between different factors or indices suggested that bull fearlessness can be improved by selecting for closely related traits, such as aggressiveness, strength or mobility. In conclusion, the results of this study have reported heritabilities for behavioural traits related to fearlessness and fighting ability that are in accordance with values already found in previous study where behaviours were recorded in different ways. Moreover, this study has provided a linearized standardized scoring system that is repeatable and reproducible among different appraisers and considering animals from different herds. Therefore, the use of an objective linear standardized scoring system substantially improved the correct assessment of behavioural traits in Lidia cattle.

## References

- Adamczyk K., Pokorska J., Makulska J., Earley B., Mazurek M. (2013) Genetic analysis and evaluation of behavioural traits in cattle. *Livest. Sci.*, **154**, 1–12.
- Almenara-Barrios J., García R. (2011) Assessment scale for behaviour in bullfighting cattle (EBL 10). Reliability and validity studies. *Arch. Zootec.*, **60**, 215–224.
- Benhajali H., Boivin X., Sapa J., Pellegrini P., Boulesteix P., Lajudie P., Phocas F. (2010) Assessment of different on-farm measures of beef cattle temperament for use in genetic evaluation. *J. Anim. Sci.*, **88**, 3529–3537.



- Calero D., Durán C.V. (2007) Genetic parameters of precise characteristics in the behaviour of a bullfight herd. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, **20**, 588.
- Calero D., González E., Durán C.V. (1997) Parámetros genéticos de características puntuales en el comportamiento durante la tienta o la lidia en reses bravas. In: II Congreso Mundial Taurino de Veterinaria. Córdoba (Spain), 27–29 November, 55–74.
- Cortés O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., Fernández J., Cañón J. (2011) Y chromosome genetic diversity in the Lidia bovine breed: a highly fragmented population. *J. Anim. Breed. Genet.*, **128**, 491–496.
- Domínguez-Viveros J., Rodríguez Almeida F.A., Núñez-Domínguez R., Ramírez Valverde R., Ruiz-Flores A. (2014) Genetic parameters and genetic trends for behaviour traits in mexican bullfighting herds. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.*, **5**, 261–271.
- Gauly M., Mathiak H., Hoffmann K., Kraus M., Erhardt G. (2001) Estimating genetic variability in temperamental traits in German Angus and Simmental cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, **74**, 109–119.
- Gebregeziabhear E., Ameha N. (2015) The effect of stress on productivity of animals: a review. *J. Biol. Agric. Health.*, **5**, 2224–3208.
- Geburt K., Piechotta M., König von Borstel U., Gauly M. (2015) Influence of testosterone on the docility of German Simmental and Charolais heifers during behavior tests. *Physiol. Behav.*, **141**, 164–171.
- González E., Durán C.V., Domínguez J.F. (1994) Heritability and repeatability of the nota de tienta and nota de lidia traits of a herd of bullfighting cattle. *Arch. Zootec.*, **43**, 225–237.
- Janssens S., Vandepitte W. (2004) Genetic parameters for body measurements and linear type trait in Belgian Bleu du Maine, Suffolk and Texel sheep. *Small Rum. Res.*, **54**, 13–24.
- Koenen E.P.C., Van Veldhuizen A.E., Brascamp E.W. (1995) Genetic parameters of linear scored conformation traits and their relation to dressage and show jumping performance in the Dutch Warmblood Riding Horse population. *Livest. Prod. Sci.*, **43**, 85–94.
- Larsen R., Warne R.T. (2010) Estimating confidence intervals for eigenvalues in exploratory factor analysis. *Behav. Res. Methods*, **42**, 871–876.
- Lomillos J.M., Alonso M.E., Gaudioso V. (2013) Analysis of the evolution of management system in fighting bull farms. Sector issues and challenges. *Inf. Tec. Econ. Agrar.*, **109**, 49–68.
- Mantovani R., Contiero B., Vevey M. (2007) Genetic evaluation of cow fighting ability in the Valdostana breed. *Ital. J. Anim. Sci.*, **6**, 156–158.
- Mendoza J.L., Markos V.H., Gonter R. (1978) A new perspective on sequential testing procedures in canonical analysis: a Montecarlo Carlo evaluation. *Multivar. Behav. Res.*, **13**, 371–382.
- Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee D.H. (2002) BLUPF90 and related programs (BGF90). In: Proceedings of 7th WCGALP. Montpellier (France), 19–23 August, 28, 07.
- Pelayo R., Solé M., Bomba M., Demyda Peyras S., Molina A., Valera M. (2014) Estimation of genetic parameters of behavioural characters in the Lidia bovine breed. In: Proceedings of the 65rd Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod. Copenhagen (Denmark), 25–29 August, 20, 286.
- Samoré A.B., Pagnacco G., Miglior F. (1997) Genetic parameters and breeding value for linear type traits in the Haflinger horse. *Livest. Prod. Sci.*, **52**, 105–111.
- Sánchez M.J., Riol J.A., Castro M.J., Gaudioso V.R. (1990) Fighting bull behaviour against horse and “muleta”: aspects relevant to the breed selection. *Arch. Zootec.*, **39**, 165–174.
- Sánchez M.J., Gómez M.D., Molina A., Valera M. (2013) Genetic analyses for linear conformation traits in Pura Raza Español horses. *Livest. Sci.*, **157**, 57–64.
- Sartori C., Mantovani R. (2010) Genetics of fighting ability in cattle using data from the traditional battle contest of the Valdostana breed. *J. Anim. Sci.*, **88**, 3206–3213.
- Sartori C., Manser M.B., Mantovani R. (2014) Relationship between number and intensity of fighting: evidence from cow fighting tournaments in Valdostana cattle. *Ital. J. Anim. Sci.*, **13**, 684–692.
- Schmidt S.E., Neuendorff D.A., Riley D.G., Vann R.C., Willard S.T., Welsh T.H. Jr, Randel R.D. (2014) Genetic parameters of three methods of temperament evaluation of Brahman calves. *J. Anim. Sci.*, **92**, 3082–3087.
- Silva B., Gonzalo A., Cañón J. (2002) Genetic parameters of behavioural traits in the bovine (*Bos taurus*). In: Proceedings of the 7th World Congr. Genet. Appl. Lives. Montpellier (France), 19–23 August, pp. 83–86.
- Silva B., Gonzalo A., Canon J. (2006) Genetic parameters of aggressiveness, ferocity and mobility in the fighting bull breed. *Anim. Res.*, **55**, 65–70.
- Statsoft, Inc. 2007. Statistica (data analysis software system), Version 8.0. www.statsoft.com.
- Valera M., Daza J., Bartolomé E., Molina A. (2010) Analysis of the evaluation methodology for behavioural parameters established on Fighting-Bulls. In: Proceedings of the 61th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod. Heraklion (Greece), 23–27 August, 16, pp. 261.
- Vostrý L., Čapková Z., Andrejsová L., Mach K., Majzlík I. (2009) Linear type trait analysis in Coldblood breeds: Czech-Moravian Belgian horse and Silesian Noriker. *Slovak. J. Anim. Sci.*, **42**, 99–106.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Description of the traits included in the behavioural linear standardized scoring system developed in the Lidia cattle population.

Table S1. Description of the traits included in the behavioural linear standardized scoring system developed in the Lidia cattle population.

Trait		Abbreviation	Definition	Lowest class <sup>2</sup>	Highest class <sup>2</sup>
Section of the Horse (Animal attitude towards the horse)	Start distance to horse	SD_HOR	Maximum distance covered by the bull when this one goes to charge the horse	1-2 m	>20
	Speed of approach to horse	SA_HOR	Elapsed time between the call made by the horse rider <sup>1</sup> and the animal's response.	Takes a long time	Immediate (1 sec.)
	Speed of charging to horse	SP_HOR	Bull's speed during the charge to the horse	walk	Fast gallop
	Humiliate to horse	HU_HOR	Position of the bull's head with respect to the horse during the charge	Saddle	Under horse blanket
	Fight with the horse	FIG_HOR	Bull's reaction when in contact with the horse	No fight	Force the bull out
Section of the Lure (Animal attitude against the lure).	Fixed attention to lure	FIX_LUR	Time that the bull remains alert in front of the lure	<20%	>80%
	Speed of approach to bullfighter	SA_ LUR	Elapsed time between the call made by the bullfighter and the animal's response	Takes a long time	Immediate (1 sec.)
	Speed of charging to lure	SP_ LUR	Bull's speed during the charge to the lure	Walk	Gallop
	Humiliate to bullfighter	HU_ LUR	Position of the bull's head with respect to the bullfighter during the charge	Hip	Ankle
	Distance covered by the bull	DI_ LUR	Number of times the bull exceeds the bullfighter's position	<20%	>80%
	Fatigue moment	FAT_ LUR	Moment of the fight in which the bull begins to show signs of fatigue	During the lure	No fatigue
	Falls of the bull	FAL_ LUR	Number of times a limb of the bull touches the ground	Disqualify (>5 falls)	Not fall

<sup>1</sup> Horse rider: is the rider of the horse who analyzes bull's features in the section of the horse.

<sup>2</sup> Class 1= lowest biological range class and Class 5-6 (all traits have 5 classes except "FAT\_LUR" with 6 classes) = highest biological range class.



### 3.3 CAPÍTULO III: ESTUDIO DE POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON LA CALIDAD DE LA CARNE EN LA RAZA DE LIDIA COMO POSIBLE USO ALTERNATIVO EN EL SISTEMA DE CRÍA DE ESTA RAZA

Este tercer capítulo está constituido por un artículo científico:

- Pelayo R, Valera M, Molina A, Avilés C. 2016. *Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle*. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.

#### RESUMEN

En el tercer y último capítulo de la presente Tesis Doctoral se presenta un estudio encaminado a caracterizar genéticamente la calidad de la carne en la raza bovina de Lidia.

La mayor parte del esfuerzo que el ganadero realiza en la cría de la raza de Lidia se dirige hacia la búsqueda de "la casta" y de la bravura del toro. No obstante, con la situación de crisis que está viviendo actualmente la ganadería de Lidia, son de gran importancia los estudios encaminados a evidenciar las cualidades cárnicas de la raza de Lidia dentro de un contexto de cría en libertad en dehesa, con una alimentación a partir de pastos naturales y bellota y con un manejo ganadero que permite a los animales realizar un ejercicio físico que repercute en las características organolépticas de la carne. Así mismo, el valor económico de la carne es fundamental en la cuenta de explotación de este tipo de ganadería ya que existe un elevado porcentaje de animales, que al no reunir las cualidades comportamentales exigidas por el ganadero tras la "tienta" de los animales, son destinados a la producción de carne. Por ello, es muy interesante examinar la posibilidad de mejorar las características cárnicas, a la vez que los aspectos comportamentales en la raza de Lidia.

El objetivo de este trabajo fue analizar en diferentes encastes de Lidia las frecuencias de varios polimorfismos en 3 genes relacionados con la ternura (CAPN1 y CAST) y la deposición grasa intramuscular de la carne (DGAT).

Se analizaron 119 individuos procedentes de 5 encastes (Domecq, Marqués de Albaserrada, Murube Urquijo, Núñez y Santa Coloma) para 4 fragmentos de ADN: 2 fragmentos en el gen CAPN1, 1 fragmento en el gen CAST y otro fragmento en el gen DGAT. Se calcularon

diferentes parámetros de variabilidad genética entre las poblaciones analizadas. Los resultados indicaron que hay diferencias entre las frecuencias alélicas halladas en los 3 genes de interés y los encastes estudiados. Para el gen CAPN1, el alelo *C del loci Ex9-g. 316 C>G* ha sido estudiado previamente y asociado con la terneza en otras razas. En nuestra población de Lidia, osciló entre 0,14 y 0,71 para los encastes Marqués de Albaserrada y Domecq respectivamente. En el gen CAST, el alelo asociado con la terneza es el *C del loci In8-g. 282 C>G* y fluctuó entre 0,46 en el encaste Murube Urquijo y 1 en Marqués de Albaserrada. Finalmente, también se encontraron grandes diferencias entre los encastes en el gen DGAT1. El cambio de *lisina* a *alanita* en el loci *Ex8-g. 232 AAAA>GCGC* está asociado con mayor contenido en grasa en los diferentes tejidos. En nuestra población la frecuencia alélica de la *lisina* varió de 0,04 en el encaste Domecq a 1 en el encaste Marqués de Albaserrada.

En conclusión hemos visto que en la raza de Lidia se presenta una alta frecuencia de los alelos analizados, que previamente han sido asociados con carnes más tiernas y de mayor contenido en grasa en la especie bovina. No obstante, sería muy interesante realizar una búsqueda en profundidad de nuevos polimorfismos en estos genes relacionados con la calidad de la carne y de la misma forma realizar un análisis de asociación entre los polimorfismos encontrados y los rasgos de interés económico en la raza de Lidia.

### 3.3.1 ARTÍCULO 4 (CAPÍTULO III). ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN CANDIDATE´S GENES FOR MEAT QUALITY IN LIDIA CATTLE

Título (español): ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS PARA LA CALIDAD DE LA CARNE EN EL GANADO DE LIDIA

Authors: **Rocío Pelayo**<sup>a</sup>, Mercedes Valera<sup>a</sup>, Antonio Molina<sup>b</sup>, Carmen Avilés<sup>c</sup>.

Affiliations: <sup>a</sup>Department of Agro-Forestry Sciences, ETSIA, University of Sevilla, Sevilla, Spain;

<sup>b</sup>Department of Genetics, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain; <sup>c</sup>Department Animal Production, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain.

Publication: **Spanish Journal of Agricultural Research** (2016), Volume 14, Issue 4, e04SC02.Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279

- Impact Index: 0,760 (Journal Citation Report, 2015).
- Subject and Quartile: " Agriculture, multidisciplinary", 2nd quartile.





## SHORT COMMUNICATION

## OPEN ACCESS

## Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle

Rocío Pelayo<sup>1</sup>, Mercedes Valera<sup>1</sup>, Antonio Molina<sup>2</sup> and Carmen B. Avilés<sup>3</sup>

<sup>1</sup> University of Seville, Dpt. of Agroforestry Science, 41013 Seville, Spain. <sup>2</sup> University of Córdoba, Dpt of Genetics, 14071 Córdoba, Spain. <sup>3</sup> University of Córdoba, Dpt Animal Production, 14071 Córdoba, Spain.

### Abstract

The aim of this paper was to analyze the segregation of some polymorphisms in three genes (*CAPNI*, *CAST* and *DGATI*) related to meat quality in the Lidia cattle breed and some of its main lineages. To that effect, 119 individuals from the Lidia breed were analyzed. Although the association between the polymorphisms and the phenotype has never been demonstrated in this breed, the absence of fixed genotypes for these polymorphisms in the studied population makes the Lidia cattle a good candidate to develop selection objectives. The clear differentiation among lineages for most of the genes studied reinforces the high reproductive isolation presented in the Lidia cattle as revealed by previous studies on the structure of the population within the Lidia breed using microsatellite markers. Considering both issues in the design of breeding schemes will be necessary to save the lineages and not to lose this valuable genetic resource. Finally, it would be necessary to carry out an in depth search for new polymorphisms in genes associated with meat quality and to perform needed association analyses between the SNPs segregating in Lidia cattle and traits of economic interest.

**Additional key words:** bullfighting; calpastatin; single nucleotide polymorphisms.

**Abbreviations used:** MNA (mean number of alleles per locus); SNP (single nucleotide polymorphisms).

**Authors' contributions:** Conceived and designed the experiments, and critical revision of the manuscript for important intellectual content: MV and AM. Performed the experiments: RP. Analyzed the data and wrote the paper: RP and CA.

**Citation:** Pelayo, R.; Valera, M.; Molina, A.; Avilés, C. B. (2016). Short communication: Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016144-9279>.

**Supplementary material** (Figs. S1, S2, S3, S4 and S5) accompanies the paper on SJAR's website.

**Received:** 11 Jan 2016. **Accepted:** 11 Nov 2016.

**Copyright** © 2016 INIA. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Funding:** Lidia cattle breed association ("Agrupación Española de Ganaderos de Reses Bravas").

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Correspondence** should be addressed to Rocío Pelayo: [rociopega55@hotmail.com](mailto:rociopega55@hotmail.com)

### Introduction

The Lidia cattle breed is one of the most important Iberian breeds reared in the traditional agro-forestry system called "dehesa". Many aspects of the breed promote great diversity, for example, the different cultural shows, that require the selection of bulls with different behavior and morphological characteristics (Pelayo *et al.*, 2015). This fact and the extreme reproductive isolation of some farms prompted a fragmentation of the population into subpopulations, traditionally called lineages with varying levels of gene flow among them (Cañon *et al.*, 2008).

Most of the efforts made in the breeding of these cattle are focused on the aggressiveness of the bull and animals without these behavioural features are dis-

carded. In these cases, the economic value and income from the meat is essential for the producer and breeder of Lidia cattle. The meat from excitable animals has lower quality than more docile animals as assessed by behavioral tests (Haskell *et al.*, 2014). An interesting strategy to enhance the profitability of the farm would be to assess the possibility of improving the characteristics of the meat, to widen the selection criteria of the Lidia cattle breed and look for alternative uses of a breed mainly reared in extensive systems which could provide an organic and healthy dietary source. Given the fact that sensory and nutritional quality of meat are becoming more and more important, different studies related to this topic have recently been carried out on Lidia cattle (Beriain *et al.*, 2011; Horcada-Ibáñez *et al.*, 2012). These authors characterized this breed from its



phenotypic make up. Conversely, no studies have been performed to determine the heritability of these traits, but limited to behavior trait studies (Pelayo *et al.*, 2016). Polymorphisms in genes associated with meat quality are one example of technology used to predict traits like tenderness or marbling. However, these associations must be validated in each particular breed.

The calpain-calpastatin complex (*CAPN1* and *CAST*) is an endogenous, calcium-dependent proteinase system (Goll *et al.*, 2003) involved in the *post-mortem* tenderization process since they regulate *post-mortem* proteolysis. The *CAPN1* gene has been mapped to chromosome 29 and several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene have been reported to be associated with meat tenderness in beef cattle (Page *et al.*, 2004), two of which produce glycine to alanine and valine to isoleucine substitutions in exons 9 and 14, respectively. According to Avilés *et al.* (2013) and Calvo *et al.* (2014) and the effect of the SNPs of the *CAST* on instrumental meat tenderness is evident in different beef populations reared in Spain. The diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1*) is a microsomal enzyme that catalyzes the final step of triglyceride synthesis (Winter *et al.*, 2002). This gene has been mapped to chromosome 14. A lysine to alanine substitution (K232A) in the *DGAT1* gene has been associated with increased milk yield and milk fat content in dairy cattle (Casas *et al.*, 2005). The aim of this paper was to analyze the frequencies of several polymorphisms in three genes related to meat quality (*CAPN1* and *CAST*) for tenderness and intramuscular fat, back fat thickness or sensory flavor and juiciness (*DGAT1*), in the whole population of Lidia cattle as well as in the main lineages currently being reared.

## Material and methods

Blood samples of 119 individuals from the Lidia breed (79 males and 40 females), from 5 different lineages were analyzed (28 Domesq, 22 Marqués de Albaserrada, 24 Murube Urquijo, 20 Núñez and 25 Santa Coloma). Genomic DNA was obtained from 200 µL of whole blood using the extraction protocol of the Do-

minion® MBL kit following the manufacturer's instructions. Four different DNA fragments were analyzed. A set of PCR primers were designed in two regions (*CAPN1* segment 1, from intron 8 to intron 9 and *CAPN1* segment 2, from exon 11 to exon 22) of the *CAPN1* gene (GenBank Acc. No. AH009246), the *CAST* gene (AY008267), and *DGAT1* gene (JQ897351-53). The primers used in the analyses are shown in Table 1. PCR reactions were carried out in a thermocycler (Eppendorf® AG, Germany) in a total volume of 25 µL containing 2 µL (80 ng) of bovine genomic DNA, 2.5 µL of PCR buffer, 0.75 µL of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1.2 µL of dNTPs (4µM), 2 µL of each primer (5 mM), 0.1 µL of Taq DNA polymerase (5U/µL) and 14.45 µL of MQ H<sub>2</sub>O. The thermal profiling consisted of a hot start step at 96 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 30 s at 96 °C, 30 s at the annealing temperature of 72 °C (all genes), 4 min at 72 °C and a final extension step of 10 min at 72 °C. The obtained amplicons were purified and visualized on 2% agarose electrophoresis gels stained with ethidium bromide. Segments 1 and 2 of the *CAPN1* gene, *CAST* and *DGAT1* genes were sequenced. All sequences were edited, assembled and aligned using the program Sequencher v.4.6 software (Gene Codes Corporation). After alignment, polymorphic sites were determined and different genotypes assigned by visual examination of the electropherograms (Fig. S1 [suppl.]). The variability parameters across loci and populations for the whole population and for each different lineage were computed using the Genetix 4.2 program (Belkhir *et al.*, 2004). Fisher's exact test was performed to assess the possible association between the frequency distribution of the different polymorphisms studied and the five lineages of our population (Statistica v.6.0 software).

## Results and discussion

Allele frequencies for each polymorphic locus are presented in Table 2. Six SNPs that were previously reported (Avilés *et al.*, 2009) were found in the *CAPN1* segment 1. According to published research, the C allele from the *CAPN1*: Ex9-g. 316 C>G was associated

**Table 1.** Amplified fragments and primers used in the analysis.

DNA fragments	Chromosome	Length of the fragments (bp)	Forward primers	Reverse primers
<i>CAPN1</i> segment 1	BTA29	669	CGGGTGAGGGTCCATGGAGGCTG	GGTGTTCAGTTGCGGAACCTCTGGCT
<i>CAPN1</i> segment 2	BTA29	765	TCCGAAGGGTGGGCTGAGCTGC	AGCCCAATGATGAGGGGTGAGCCTG
<i>CAST</i>	BTA7	270	CGGCACCTCTGTGTGGCATCAGCA	GCTTGGGTAGGCTTTTGGCTGAAAACACG
<i>DGAT</i>	BTA14	727	TCCCACAGTGGGCTCCGTGCTG	GCCAGGCTGCCTGCTCACCTTG

**Table 2.** Allele frequencies for the identified SNPs in *CAPNI*, *CAST* and *DGATI* genes and Fisher's exact association test with the five lineages of Lidia cattle breed. In parenthesis, number of samples of each lineage.

Genes (loci) <sup>[1]</sup>	Allele <sup>[2]</sup>	Domecq (28)	Marqués de Albaserrada (22)	Murube Urquijo (24)	Núñez (20)	Santa Coloma (25)	Overall population (119)	Fisher's test <sup>[3]</sup>
<i>CAPNI</i> segment 1								
In8-g. 80 C>T	C	0.37	0.80	0.59	0.66	0.39	0.63	19.33*
In8-g. 302 C>G	C	0.45	0.94	0.70	0.75	0.54	0.64	15.11 ns
In8-g. 310 A>G	A	0.56	0.14	0.32	0.21	0.46	0.38	12.79 ns
Ex9-g. 316 C>G	C	0.71	0.14	0.36	0.29	0.63	0.45	20.01*
In9-g. 445 C>T	C	0.28	0.71	0.60	0.64	0.10	0.49	21.49*
Ex10-g. 524 A>C	A	0.25	1.00	0.80	1.00	0.00	0.64	11.01*
<i>CAPNI</i> segment 2								
In13-g. 4506 C>G	C	0.50	0.83	0.56	0.82	0.37	0.58	23.60***
Ex14-g. 4558 G>A	G	0.90	1.00	0.90	0.94	0.98	0.94	11.04 ns
In14-g. 4685 C>T	C	0.82	0.50	0.58	0.79	0.73	0.72	10.72 ns
<i>CAST</i>								
In8-g. 282 C>G	C	0.48	1.00	0.46	0.58	0.60	0.57	35.30***
<i>DGATI</i>								
Ex8-g. 232 AAAA>GCGC	AAAA	0.04	1.00	0.14	0.07	0.58	0.28	35.70***

<sup>[1]</sup> Nucleotide positions are deduced from reference sequences EU386166-83 for *CAPNI* segment 1, AF248054 *CAPNI* segment 2, AY008267 for *CAST* and JQ897351-53 for *DGATI*. <sup>[2]</sup> "Allele" shows the allele that is reported to have positive effect on tenderness (decreases shearforce). <sup>[3]</sup> \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns: no significant differences

with lower shear force values (Page *et al.*, 2004; Schenkel *et al.*, 2006). Highlighted differences between lineages for this SNP were found in the Lidia cattle breed. The C allele frequency ranged from 0.71 to 0.14 for Domecq and Marqués de Albaserrada lineages, respectively. Overall, the population in the Lidia cattle breed presented a frequency of the C allele of 0.45. Avilés *et al.* (2009) found in the Spanish maternal beef breeds frequencies ranging from 0.11 (Avileña breed) to 0.29 (Retinta breed) while Van Eenennaam *et al.* (2007), showed in European continental breeds, frequencies between 0.05 for Charolais breed and 0.13 for Simmental breed. Three SNPs were detected in the *CAPNI* segment 2, two of which were not published before: In13-g. 4506 C>G and In14-g. 4685 C>T, see Figs. S1-S5 [suppl.]. Page *et al.* (2004) associated the G allele from *CAPNI*: Ex14-g. 4558 G>A with lower shear force values. The G allele frequency ranged between 1.00 in Marqués de Albaserrada lineage to 0.90 in Domecq and Murube Urquijo lineages. Overall, the frequency of the G allele for the population in the Lidia cattle breed is 0.94, while Allais *et al.* (2011) published frequencies in European continental breeds ranging from 0.76 (Charolais breed) to 0.64 (Limousin breed). However, it would be interesting to perform an in depth study of the two new markers; *CAPNI*: In13-g. 4506 C>G and In14-g. 4685 C>T. Frequencies for the C allele from the *CAST*: In8-g. 282 C>G SNP ranged between 1.00 in Marqués de Albaserrada lineage to 0.46 in Murube Urquijo lineage. Overall, the population

presented a frequency of 0.57 of the allele associated with tender meat (Schenkel *et al.*, 2006). Van Eenennaam *et al.* (2007) found frequencies for the C allele ranging from 0.63 (Angus breed) to 0.73 (Limousin breed). Finally, remarkable differences were found in Lidia cattle between lineages for *DGATI*: Ex8-g. 232 AAAA>GCGC. The lysine variant of the marker has been associated with a higher lipid content in different tissues (Thaller *et al.*, 2003; Avilés *et al.*, 2013). In our population, the lysine allele frequency ranged from 1.00 in Marqués de Albaserrada lineage to 0.04 in Domecq lineage. Overall, the population in Lidia cattle breed presented low frequency of the KK genotype (0.28). This result was consistent with those published in Lidia cattle breed (0.21) by Kaupé *et al.* (2004).

Our results showed that there are statistically significant differences in the distribution of frequencies of the studied markers and the different lineages. The genetic variability was low in all lineages (Table 3) which is partitioned into very few farms that impose a high reproductive isolation, with a higher heterozygosity in the Murube Urquijo lineage (0.409) and a lower heterozygosity (0.197) in the Marqués de Albaserrada lineage (in accordance with the frequencies mentioned previously). This higher reproductive isolation of all the Lidia lineages (with regards to other cattle breeds) imposed by breeders with the objective to maintain their branded features (Sanz *et al.*, 2014) may be the cause of the heterozygosity deficit observed in the five lineages. The effective size within the Lidia cattle lineages is very low. Therefore, it

**Table 3.** Expected (He) and observed (Ho) heterozygosity and mean number of alleles per locus (MNA) values in the five *lineages* of Lidia breed for the *CAPN1*, *CAST* and *DGAT1* genes analysed. Standard deviation in parenthesis.

Lineage	He	Ho	MNA
Domecq	0.380 (0.146)	0.267 (0.189)	2
Marqués de Albaserrada	0.197 (0.187)	0.167 (0.212)	1.636
Murube Urquijo	0.409 (0.109)	0.310 (0.245)	2
Núñez	0.313 (0.190)	0.300 (0.258)	1.818
Santa Coloma	0.364 (0.193)	0.251 (0.251)	2
Overall population	0.430 (0.110)	0.274 (0.207)	2.091

is impossible to find unrelated animals within different lineages. The mean number of alleles (MNA) per lineage varied from 2 in Domecq, Murube Urquijo and Santa Coloma lineages to 1.636 in Marqués de Albaserrada, with a mean for the overall population of 2.091.

The results of this study in the Lidia cattle breed show the frequency of the alleles previously associated with more tender meat and higher fat content. Finally, it would be interesting to carry out an in depth search for new polymorphisms in genes associated with meat quality and the need of performing association analyses between the SNPs segregating in Lidia cattle and traits of economic interest.

## Acknowledgements

We acknowledge the collaboration of the Lidia Cattle Breed Association (AEGRB).

## References

- Allais S, Journaux L, Levéziel H, Payet-Duprat N, Raynaud P, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C, *et al.*, 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and  $\mu$ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J Anim Sci* 89(1): 1-11. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3063>.
- Avilés C, Azor PJ, Pannier L, Hamill RM, Membrillo A, Molina A, 2009. New single nucleotide polymorphisms in the  $\mu$ -calpain gene in Spanish maternal beef breeds. *Anim Biotechnol* 20 (3): 161-164. <https://doi.org/10.1080/10495390902876115>.
- Avilés C, Polvillo O, Peña F, Juárez M, Martínez AL, Molina A, 2013. Associations between DGAT1, FABP4, LEP, RORC, and SCD1 gene polymorphisms and fat deposition in Spanish commercial beef. *J Anim Sci* 91 (10): 4571-4577. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6402>.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F, 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Beriaín MJ, Horcada A, Lizaso G, Insausti K, Purroy A, 2011. Meat quality from fighting bulls in Spain. *Revista Científica (Venezuela)* XXI (1): 88-95. <http://www.redalyc.org/pdf/959/95918054014.pdf>.
- Calvo JH, Iguácel LP, Kirinus JK, Serrano M, Ripoll G, Casasús I, Joy M, Pérez-Velasco L, Sarto P, Albertí P, Blanco M, 2014. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Sci* 96 (2): 775-782. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.003>.
- Cañón J, Tupac-Yupanqui I, García-Atance MA, Cortes O, García D, Fernández J, Dunner S, 2008. Genetic variation within the Lidia bovine breed. *Anim Genetics* 39 (4): 439-445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01738.x>.
- Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Brennemant RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, Chase Jr CC, 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 83 (1): 13-19. <https://doi.org/10.2527/2005.83113x>.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J, 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83 (3): 731-801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>.
- Haskell MJ, Simm G, Turner SP, 2014. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Frontiers in Genetics* 5: 368. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00368>.
- Horcada-Ibáñez A, Polvillo-Polo O, Valera-Córdoba M, Juárez-Davila M, 2012. Influence of season on intramuscular fatty acid profile of fighting bull. *Agrociencia (Mexico)* 46: 467-479.
- Kaupe B, Winter A, Fries R, Erhardt G, 2004. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J Dairy Res* 71 (2): 182-187. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000032>.
- Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, White SN, Bennett GL, Keele JW, *et al.*, 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J Anim Sci* 82 (12): 3474-3481. <https://doi.org/10.2527/2004.82123474x>.
- Pelayo R, Valera M, Molina A, Royo LJ, 2015. Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain. *Anim Genet* 46 (3): 312-315. <https://doi.org/10.1111/age.12278>.
- Pelayo R, Solé M, Sánchez MJ, Molina A, Valera M, 2016. Behavioural linear standardized scoring system of the

- Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters. *J Anim Breed Genet* 133 (5): 414-421. <https://doi.org/10.1111/jbg.12198>.
- Sanz A, Martin-Burriel I, Cons C, Reta M, Poblador A, Rodellar C, Zaragoza P, 2014. Genetic diversity, structure and individual assignment of Casta Navarra cattle: a well-differentiated fighting bull population. *J Anim Breed Genet* 131(1): 11-18. <https://doi.org/10.1111/jbg.12037>.
- Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H, Wilton JW, 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci* 84(2): 291-299. <https://doi.org/10.2527/2006.842291x>.
- Thaller G, Krämer W, Winter A, Kaupe B, Erhardt G, Fries R, 2003. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J Anim Sci* 81 (8): 1911-1918. <https://doi.org/10.2527/2003.8181911x>.
- Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, Franke DE, Thomas MG, 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J Anim Sci* 85 (4): 891-900. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-512>.
- Winter A, Krämer W, Werner FAO, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J, Womack JE, Thaller G, Fries R, 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:Diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *P Nat Acad Sci USA* 99 (14): 9300-9305. <https://doi.org/10.1073/pnas.142293799>.



# **DISCUSIÓN GENERAL**





## 4. DISCUSIÓN GENERAL

La raza bovina de Lidia se caracteriza por una enorme diversidad genética y morfológica distribuida entre ganaderías y encastes, formados estos últimos a través de la selección realizada a partir de las castas fundacionales de procedencia, o a partir de diversos cruzamientos entre castas o encastes del mismo tronco, habiéndose extinguido en la actualidad muchos de ellos. De estos encastes y de sus cruzamientos proceden la mayoría de las ganaderías que han llegado a nuestros días, si bien están en continua evolución. Dada su principal aptitud productiva y a diferencia de otras razas bovinas, esta raza ha sido seleccionada durante siglos dando prioridad a caracteres de comportamiento relacionados con la lidia. Presenta gran variedad de tipos de encornaduras y de pelajes, con oscilaciones extremas de perfil fronto-nasal, proporciones, tamaño, peso, etc.

Las asociaciones de ganaderos oficialmente reconocidas para la gestión del Libro Genealógico de la Raza Bovina de Lidia (LGRBL), son las siguientes:

- Unión de Criadores de Toros de Lidia.
- Asociación de Ganaderías de Lidia.
- Agrupación Española de Ganaderos de Reses Bravas.
- Ganaderos de Lidia Unidos
- Asociación de Ganaderos de Reses de Lidia.

En la actualidad las cinco Asociaciones tienen autoridad para la gestión del Libro Genealógico. No obstante, en coordinación con el MAGRAMA se están haciendo esfuerzos por unificar toda la información en un Libro Genealógico único (B.O.E. nº 129 del 31-5-2011). En el marco de la mejora genética, podemos distinguir tres actividades principales desarrolladas hasta ahora por las distintas asociaciones oficialmente reconocidas para la gestión del LGRBL, con distinto énfasis en cada una de ellas:

- **Organización de las ganaderías alrededor de los actuales encastes:** Este conjunto racial, que es lo que denominamos raza de lidia, tiene una estructura compleja en la que, a diferencia del resto de razas bovinas, un gran porcentaje de variabilidad genética es aportada por los encastes (aproximadamente se puede estimar entre un 30 y un 45% dependiendo del carácter que se considere). Por esta razón, la conservación



de la diversidad genética de la raza requiere la conservación de los encastes, o argumentando al contrario, incrementar el riesgo genético de los encastes reduce la diversidad genética del conjunto racial. Consideramos, por lo tanto, prioritario tratar de organizar las ganaderías en función de las variedades reconocidas en el prototipo racial de la raza bovina de Lidia (BOE 2001) para tratar de establecer el énfasis que se debe asignar a la conservación y a la selección.

- **Planificación de apareamientos para minimizar el incremento en endogamia:** Aunque algunos encastes están representados por numerosas ganaderías, en otros casos sólo una o un número muy reducido de ganaderías representan al encaste. Es evidente que en esta situación, en la que algunos tamaños efectivos que se han determinado son muy reducidos ( $< 40$ ), la acción prioritaria es proponer apareamientos de mínimo parentesco para, posteriormente, intentar otras medidas de intercambio de material, cuando pueda ser factible, con el fin de incrementar el censo efectivo de las líneas.
- **Estimación del mérito genético de toros y vacas para un conjunto de caracteres de comportamiento relacionados con la lidia:** La tercera acción genética se ha centrado en el registro de información fenotípica estandarizada, incluyendo la puntuación de un conjunto de caracteres de comportamiento relacionados con la lidia, que ha variado de una asociación a otra, con el fin de tener información sobre la componente genética subyacente a estos caracteres y la posibilidad de practicar selección.

Los objetivos concretos del Programa de Mejora son:

- Conservar la variabilidad genética de la raza bovina de Lidia, especialmente de aquellos encastes o líneas que más contribuyen a la diversidad de la raza en su conjunto y que por sus tamaños efectivos reducidos puedan estar en una situación precaria.
- Mejora de caracteres que afectan al comportamiento durante la lidia (cada ganadero podrá utilizar la información derivada de las valoraciones genéticas en la dirección que desee para realizar la elección de sus reproductores y el diseño de apareamientos, de acuerdo con sus objetivos de selección). Los caracteres funcionales a recoger,

comunes para todo tipo de espectáculos taurinos y tienta, serán los definidos de la siguiente forma:

- Bravura: capacidad del animal para acometer hasta el final del espectáculo o tienta.
- Fuerza: vigor, robustez y resistencia durante todo el espectáculo o tienta.
- Movilidad: capacidad de desplazarse el animal con agilidad y velocidad, cuándo y hacia dónde se le cite.

Fijeza: persistencia de la atención durante todo el espectáculo o tienta, orientándose sólo hacia los estímulos del actuante.

#### **4.1 ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL TORO DE LIDIA. RELACIÓN CON OTRAS RAZAS BOVINAS**

Del Uro proceden todas las razas de toros bravos, lo que justifica la gran semejanza existente en un buen número de bovinos que se encuentran en diversas regiones europeas, en estado semisalvaje. Parece ser, que es en la Era Cuaternaria cuando por primera vez aparecen restos del Uro o la forma primitiva del toro bravo actual, evidenciándose su larga evolución filogenética en el transcurrir de los tiempos. Un minucioso estudio realizado sobre fósiles encontrados, llevan a la conclusión de que los de eras más modernas, son más parecidos a los de hoy (Herrero & Herrero 2001). Como consecuencia de esta coexistencia de la especie ancestral, el Uro, y las poblaciones de bovino doméstico que derivan de la salvaje, domesticadas en Oriente Próximo, han existido numerosas teorías sobre la posibilidad de cruzamiento entre ejemplares de la población salvaje y animales considerados de lidia.

Cortés (2008) argumenta que el Uro, ancestro salvaje de los bóvidos actuales, sufrió varios procesos de domesticación en diferentes momentos y regiones del mundo que comenzaron hace unos 10.000 años. Mientras que en el subcontinente indio el bovino doméstico que aparece pertenece a la subespecie *Bos taurus indicus*, tipo cebuino (bóvidos con joroba), en Europa el tipo de bóvido doméstico que aparece es el perteneciente a la subespecie *Bos taurus taurus*, tipo taurino (bóvidos sin joroba). En África, aunque existe alguna controversia, parece claro que existió un proceso de domesticación, diferente al que se produjo en Oriente Próximo, de bóvidos sin joroba (*Bos taurus taurus*) que fue seguido por migraciones de bóvidos cebuinos (*Bos taurus indicus*) algunos miles de años después.

En el estudio de la biodiversidad se pueden considerar tres componentes, diversidad taxonómica, ecológica y genética. La F.A.O. define la diversidad genética como la variedad genética en los distintos recursos génicos animales, por ejemplo, las razas de una especie (Henson 1992), que a nivel molecular se define como la relación existente entre la diversidad y la cantidad de alelos conservados (Smith 1984; Crossa *et al.* 1993). Los análisis de la variación génica pueden proporcionar información de la estructura génica y de la historia evolutiva de las poblaciones.

El ADN mitocondrial ha permitido confirmar las evidencias mostradas por los restos arqueológicos en el origen y evolución del género *Bos* y particularmente de dos de sus ramas, los cebuinos (*Bos indicus*) y taurinos (*Bos taurus*) fechando su bifurcación hace unos 100.000 años y su domesticación independiente hace 10.000 años, en Oriente Próximo los taurinos y en el sureste de Pakistán los cebuinos (Loftus *et al.* 1994; Bradley *et al.* 1996; Troy *et al.* 2001). En las razas europeas se han identificado cuatro haplotipos principales siendo uno el mayoritario (T3) y otros dos minoritarios (T y T2). Un cuarto haplotipo (T1) se describió por primera vez en razas africanas y aparece con una frecuencia muy baja en las europeas, hecho que ha sido utilizado para plantear un tercer origen de domesticación que se situaría en África (Cymbron *et al.* 1999; Troy *et al.* 2001). En las razas de la Península Ibérica dicho haplotipo aparece con una frecuencia mayor, explicado por la proximidad geográfica entre la Península y África y la expansión de los musulmanes por la Península en el siglo VIII, no obstante estudios recientes han identificado dicho haplotipo en restos arqueológicos encontrados en Atapuerca y fechados en el año 1880 antes de Cristo, por lo que se cree que la influencia africana en las razas bovinas peninsulares fue anterior a la expansión musulmana (Anderung *et al.* 2005; Beja-Pereira *et al.* 2006).

Recientemente a este grupo de 4 haplotipos se ha unido otros dos, uno correspondería al aparecido mayoritariamente en las razas criollas (T1 - 16053C-16122C-16139T-16196 o T1\*) (Miretti *et al.* 2002; Carvajal-Carmona *et al.* 2003; Miretti *et al.* 2004; Lirón *et al.* 2006) originado a partir del africano y que también ha sido descrito en razas españolas y el denominado T4 descrito en razas del Noreste de Asia (Mongolia, Norte de China, Corea y Japón) (Mannen *et al.* 2004).

En el caso del toro de Lidia se han identificado todos los haplotipos descritos menos el T4, identificado en razas asiáticas. La proporción entre los haplotipos se aleja de la de las razas del

centro de Europa y es parecida a la que se encuentra en las razas Mediterráneas (T3 81% y T1 17%). La elevada frecuencia del haplotipo africano es una de las razones que ha contribuido a la elevada variabilidad genética de la raza de Lidia respecto al resto de las razas europeas. Por tanto, en la raza de Lidia se han identificado dos líneas maternas principales correspondientes al haplotipo europeo (T3) y al africano (T1). La influencia materna del ganado africano varía mucho de un encaste a otro, así, en 5 encastes (Pedrajas, Antonio Pérez, Urcola, Partido de Resina y María Montalvo) no se identificó el haplotipo T1 y, sin embargo, en el caso del encaste Miura su porcentaje es superior al 50%, variando en el resto entre un 3 y un 31% (Cortés 2008).

La localización de las vacadas fundacionales, ancestros de los actuales encastes, en Andalucía y por tanto muy próximas al continente africano ha podido facilitar los cruces entre el ganado de ambos continentes, de lo que se tienen pruebas desde la Edad del Bronce (Anderung *et al.* 2005).

Finalmente, aunque hay ciertas carencias de datos en cuanto a la información que nos ofrecen las líneas maternas en ganado bovino, el ADN mitocondrial sigue siendo una herramienta fundamental en el ámbito de la genética desde finales del siglo XX, siendo de especial interés en genética forense en humanos y genética de poblaciones.

Por el contrario, el proceso de localización de genes en el cromosoma Y bovino todavía se encuentra en desarrollo. Los marcadores del cromosoma Y por el momento son escasos y la mayoría de ellos que se aislaron en la región PAR son monomórficos o presentan un elevado número de copias (Liu *et al.* 2002; Van Hooft *et al.* 2002). Una de las características más representativas del cromosoma Y es su naturaleza repetitiva, lo que hace que el descubrimiento de marcadores útiles en especies no modelo sea muy difícil. La naturaleza repetitiva del cromosoma Y se postula como un mecanismo para mantener los genes específicos del cromosoma Y en un ambiente no recombinante que podría erosionar al cromosoma Y con un número elevado de mecanismos entre los que se incluye el estado de hemizigosis (Vallender & Lahn 2004; Murphy *et al.* 2006). Los primeros estudios filogenéticos en cromosoma Y de ganado se hicieron con un pequeño número de microsatélites. Se conocen pocos marcadores microsatélites (Bishop *et al.* 1994; Vaiman *et al.* 1994; Mezzelani *et al.* 1995; Kappes *et al.* 1997; Liu *et al.* 2004) y hasta el momento, sólo 5 SNP específicos del cromosoma Y han sido aislados (Gotherstrom *et al.* 2005). Los marcadores INRA124 y INRA126 desarrollados por Vaiman *et al.* (1994) son dos de los más utilizados para hacer estudios de

introgresiones de *B. indicus* en *B. taurus*. El marcador polimórfico INRA124 descrito por Hanotte et al. (2000), fue empleado en los trabajos de Edwards et al. (2000, 2007) y también usado por Giovambattista (2000). Li et al. (2007) utilizaron los marcadores INRA124, INRA126, INRA189, BM861 y BYM-1 para diferenciar *B. indicus* y *B. taurus*. Todos estos estudios permiten diferenciar a *B. indicus* y *B. taurus* gracias al marcador INRA 124.

Otros microsatélites utilizados para evaluar la variabilidad genética del cromosoma Y del ganado doméstico son el UMN0103 y el UMN2404 (Liu et al. 2003), ambos marcadores presentan más de una copia (Cai et al. 2006). Estos dos microsatélites permiten diferenciar también *B. indicus* de *B. taurus*. Todos estos estudios han sido realizados en áreas restringidas, no llegándose a hacer un análisis geográfico global.

Götherström et al. (2005) encontraron 5 SNP (DBY1, DBY7, UTY19, ZFY4 y ZFY5), un microsatélite (DBY1) y una delección (ZFY5-indel) que permiten distinguir 3 haplogrupos en el cromosoma Y bovino, el Y1, el Y2 y el Y3. Los dos primeros haplogrupos están presentes en *B. taurus*, mientras que el tercero, el Y3, está presente solamente en *B. indicus*. El haplogrupo Y1 se correspondería con muestras procedentes del norte de Europa, mientras que el haplogrupo Y2 se correspondería con muestras procedentes del sur de Europa. Götherström et al. (2005) utilizaron en su trabajo ADN antiguo, sugiriendo que los individuos del haplotipo Y2 se corresponderían con los individuos domesticados en el cercano oriente mientras que los individuos del haplotipo Y1 serían resultado de la introgresión de uros locales en el ganado domesticado. Sin embargo, (Bollongino et al. 2008), usando el SNP UTY 19 y la delección ZFY5-indel, y (Svensson & Götherström 2008) usando el SNP UTY19, realizan estudios con ADN antiguo de uros medievales procedentes de distintas partes de Europa comparándolas con muestras modernas. Los resultados de ambos trabajos no apoyan la hipótesis presentada por Götherström et al. (2005) respecto a los orígenes de los haplogrupos Y1 e Y2.

Posteriormente, (Ginja et al. 2009) realizan un estudio combinando información proveniente de los SNP descritos por Götherström et al. (2005) y un grupo de 7 microsatélites (DBY1, BM861, INRA124, INRA189, UMN0103, UMN0307 y UMN0504) de los cuales 6 son polimórficos (todos a excepción del UMN0504). Este estudio desde el punto de vista metodológico es el que aportaría más información, ya que combina información obtenida con SNP y microsatélites. Desde el punto de vista geográfico se trata de un trabajo realizado en un área geográfica restringida, Portugal, por lo que quedaron muchas incógnitas por despejar.

Un reciente estudio presentado en esta Tesis ha aportado nuevos conocimientos sobre la filogenia bovina (Pelayo *et al.* 2017); en primer lugar, se ha identificado un nuevo haplogrupo (Y1.2) presente en el *B. taurus* (diferente a los 3 haplogrupos ya descritos por diferentes investigadores). En segundo lugar se ha visto que algunas razas bovinas españolas contienen una diversidad genética única de gran importancia en la historia evolutiva de la especie, ya que tras una inequívoca correspondencia entre los nuevos haplotipos encontrados en este estudio con los haplotipos detectados en trabajos previos, mas la alta representación del ganado mundial utilizado en este estudio (1507 individuos pertenecientes a 57 poblaciones diferentes) indican que el nuevo haplogrupo Y1.2 es exclusivo del ganado español.

Estos hallazgos apoyan la evidencia de la acumulación de diversidad genética en la Península Ibérica (Hewitt 2001) como resultado de las migraciones humanas y ganaderas de Europa Central y el cercano Oriente siguiendo rutas mediterráneas y del Norte de África (Beja-Pereira *et al.* 2003) así como la influencia de introgresión del Uro en el ganado doméstico (Upadhyay *et al.* 2016).

En la bibliografía hemos encontrado estudios que han mostrado interés en la variabilidad genética de la vía paterna de la raza bovina de Lidia (Ginja *et al.* 2009; Perez-Pardal *et al.* 2010; Cortes *et al.* 2011). Sin embargo, estos investigadores analizaron la raza de Lidia sin tener en cuenta la subdivisión que presenta la misma en castas y encastes. Sus resultados mostraron que esta raza es muy similar a cualquier otra raza de la Península Ibérica, mostrando una elevada proporción de haplotipos Y2 y una baja frecuencia de haplotipos Y1. Tal y como se demuestra en uno de los artículos que componen esta Tesis, nuestros resultados identificaron a la raza de Lidia como algo más que una simple raza; es decir, como un agrupamiento racial de diferentes poblaciones y orígenes, y que la mayor parte de la variabilidad genética se encuentra en los encastes de esta raza. En términos de conservación, sería mejor no considerar esta raza como una unidad, sino considerar la casta o mejor aún el encaste, como el objetivo de los esfuerzos de conservación (Pelayo *et al.* 2015).

Después de todos los análisis genéticos realizados en la raza de Lidia se podría considerar a esta como una subespecie, o una “raza de razas”, por la gran distancia genética entre las diferentes líneas (castas y encastes) que la conforman (Cañón 2011). Esta raza se divide en distintos encastes, remontándose sus orígenes al de la propia raza, descendiendo directamente

los encastes actuales de las castas fundacionales. Los encastes engloban generalmente varias ganaderías, aunque existen encastes con una sola ganadería asociada.

Actualmente, la raza de Lidia está formada por cinco Castas Fundacionales. La **Casta Navarra** que subsiste en explotaciones de Navarra y Aragón, procede del ganado traído por los Celtas que adquieren su condición de bravura al desarrollarse en estado salvaje. La **Casta Cabrera** se conserva únicamente en el encaste Miura y no pura como tal, manteniendo unas características zootécnicas y de comportamientos muy similares a los actuales. Lo mismo ocurre con el encaste Pablo Romero, único representante de la **Casta Gallardo** cruzada con líneas Jijonas y Vazqueñas. La **Casta Vazqueña** conserva dos líneas principales, la de Veragua y la de Concha y Sierra, así como su aportación en el cruce que creó los encastes Vega-Villar e Hidalgo Barquero con animales de la Casta Vistahermosa. La **Casta Vistahermosa**, con sus múltiples ramas, constituye la base fundamental de la raza de Lidia. De ella derivan trece encastes en pureza y otros tres por realización de cruces (Rodríguez 2002).

Los ejemplares derivados de cada una de estas castas y encastes responden a unos prototipos morfológicos y de comportamiento considerablemente definidos, fijados y difundidos en el conjunto de la cabaña brava y que permiten diferenciar a los individuos pertenecientes a cada uno de ellos (Cañón 2011). Independientemente de los caracteres morfológicos comunes en la raza de Lidia, existen muchos aspectos que fomentan la diversidad de caracteres étnicos en función del encaste del que deriven (BOE 2001).

#### **4.2 EL COMPORTAMIENTO ANIMAL: LA EVALUACIÓN DE LA BRAVURA EN LA RAZA DE LIDIA**

Los animales de la raza bovina de Lidia son juzgados por su comportamiento, a diferencia de lo que ocurre en otras razas de su misma especie que se evalúan por su habilidad para producir, por ejemplo, cantidad o calidad de leche o de carne. Es fácil apreciar una gran diferencia entre unos caracteres de comportamiento subjetivos y otros de tipo productivos que pueden ser evaluados de forma más cuantitativa y con mayor precisión.

Desde el inicio de las civilizaciones, el comportamiento de los animales ha sido objeto de interés para el hombre, siendo los antiguos griegos los primeros en registrarlo de manera sistemática. Hacia el siglo IV a.C. Aristóteles se dedicó a identificar y clasificar el comportamiento animal recopilando este material en 2 volúmenes. Esta información presentaba

algunas imperfecciones dado que se basaba en numerosos testimonios de viajeros y exploradores que habían estado en tierras lejanas y no en experiencias propias. Desafortunadamente gran parte del entusiasmo por el estudio sistemático del comportamiento animal murió con Aristóteles, aunque sus ideas sobre el cambio evolutivo entre especies fueron fundamentales dos mil años después (Maier 2001).

Hacia la primera mitad del siglo XVII, el reconocido filósofo francés René Descartes argumentó que "los cuerpos de los animales y los hombres actúan enteramente como máquinas, y se mueven de acuerdo con leyes meramente mecánicas" y por lo tanto no tenía ningún sentido estudiar su comportamiento. Después de Descartes, otros investigadores explicaron la conducta como una reacción a sucesos puramente físicos, químicos o mecánicos. Durante los tres siglos posteriores, el pensamiento científico acerca del comportamiento osciló entre la visión mecanicista, según la cual los animales son "autómatas", moviéndose por la vida sin conciencia ni sentido de su propia existencia; y una visión opuesta según la cual los animales tienen pensamientos y sentimientos similares a los de los seres humanos (Grandin 1998).

Fue necesario esperar hasta la publicación de "El Origen de las Especies" de Charles Darwin en el siglo XIX para que el estudio científico del comportamiento animal comenzara a tratarse de forma más científica (Maier 2001). Darwin observó que los animales comparten muchas características físicas, siendo uno de los primeros investigadores en ocuparse de la variación dentro de una misma especie, tanto en el comportamiento como en la apariencia física. Él creía que la selección artificial y la selección natural estaban íntimamente asociadas y delineó con gran sagacidad la teoría de la evolución sin tener ningún conocimiento de la Genética. En el año 1871 se publica "El Origen del Hombre", en el que concluye que los rasgos del temperamento de los animales son heredados y, al igual que otros científicos de su época, estaba convencido que los animales tenían capacidad de pensar y que poseían sensaciones subjetivas (Grandin 1998).

Fue precisamente en el siglo XIX cuando se realizaron los primeros estudios experimentales en comportamiento animal debido al eco de las teorías de Darwin (Maier 2001), y a finales del mismo, era evidente para aquellos que estudian el comportamiento animal en condiciones naturales que no todas las conductas podían ser explicadas desde el punto de vista mecanicista (Grandin 1998).



Los factores genéticos influyen sobre las diferencias de temperamento en animales tan distintos como las ratas, los pollos, las vacas, los cerdos y los humanos (Reese *et al.* 1983; Fordyce *et al.* 1988; Kagan *et al.* 1988; Hemsworth *et al.* 1990; Fujita *et al.* 1994). En la naturaleza nos encontramos con que algunos individuos son cautelosos y temerosos mientras que otros son calmos y plácidos. (Boissy 1995) determinó que la temerosidad es una característica psicológica básica de cada individuo, que lo predispone a percibir y a responder de una forma similar a una amplia gama de sucesos potencialmente temibles. En todos los animales, los factores genéticos influyen sobre las reacciones a situaciones que producen miedo (Davis 1992; Boissy & Bouissou 1995). Por lo tanto, el temperamento está determinado en parte por la respuesta del individuo ante el miedo. (Rogan & LeDoux 1996) sugieren que el miedo es el producto de un sistema neural que evolucionó para detectar el peligro, y que hace que el animal genere una respuesta que lo proteja.

Los individuos reaccionan ante distintas situaciones con un comportamiento individualizado, según su temperamento. Éste es el resultado de la organización hormonal, nerviosa y física del individuo. A menudo el concepto de temperamento se restringe a la expresión o modo en que los animales perciben y reaccionan frente a estímulos que originan miedo (Boissy & Bouissou 1995). Se habla entonces de reactividad emocional, carácter miedoso o “fearfulness” en terminología anglosajona. En nuestro ámbito, podríamos adoptar la definición de (Burrow 1997), para quien temperamento es la respuesta de comportamiento de un animal al manejo producido por el hombre; sería el equivalente a la personalidad en humanos.

El temperamento puede valorarse mediante observadores adiestrados, a través de escalas con puntuaciones predefinidas y mediante test de comportamiento. Estos últimos han sido revisados por (Burrow 1997) y (Palacio 2000). Muchos de los test están destinados a evaluar el miedo para lo cual se imitan condiciones peligrosas con las que se encuentran los animales en su ambiente natural o de producción. Con ello se pretende facilitar la comparación de la reactividad psicobiológica entre individuos de forma estandarizada (Boissy 1998).

Existen test que restringen físicamente el comportamiento del animal, en los que se observan o registran vocalizaciones, la cantidad de movimiento, coces, intentos de huir, etc. Otro grupo importante de test se realizan dejando que el animal se mueva libremente, en un área grande y en presencia del observador. Entre éstos cabe citar el test de aproximación, de distancia de huida, de docilidad, aproximación-evasión, el test de campo abierto (open field test) y la rapidez

de huida, entre otros. Cabe también la posibilidad de evaluar los movimientos de los animales en distintas instalaciones y dispositivos, aunque los resultados suelen ser difíciles de interpretar.

Diversos trabajos han puesto de manifiesto que los procesos de miedo y ansiedad se encuentran en parte bajo control genético, lo cual puede contribuir a la existencia de diferencias individuales (Bouchard Jr *et al.* 1990). En varias especies domésticas, el componente genético es responsable de parte de las diferencias individuales en la respuesta a los seres humanos. La heredabilidad de la reacción de defensa a los humanos ha mostrado valores consistentes en bovinos lecheros (Dickson *et al.* 1970), bovinos de carne (Le Neindre *et al.* 1995), cerdos (Hemsworth *et al.* 1990), y perros (Goddard & Beilharz 1984).

Dado que la reactividad emocional está en cierta medida bajo control genético, se podrían iniciar programas de selección para reducir los comportamientos relacionados con el miedo y la ansiedad en los animales domésticos (Le Neindre *et al.* 1996). El desarrollo de investigaciones encaminadas a evaluar patrones de reactividad psicofisiológica en los animales domésticos podría mejorar nuestro conocimiento de los factores y mecanismos que gobiernan las causas del estrés, ofreciendo nuevas estrategias para la mejora del bienestar y la eficiencia de producción (Piedrafita & Manteca 2002).

Posiblemente todos los ganaderos de toro bravo registran el comportamiento de las vacas y los toros de sus ganaderías. El registro que realizan no consiste sólo en una valoración global del comportamiento del animal, sino que se anotan puntuaciones de varias características específicas del comportamiento (Vallejo *et al.* 2001).

El método de selección en el ganado bravo ha variado poco desde el momento en el que comenzó a realizarse, siendo los tentaderos de hembras y machos la manera más eficaz para evaluar las potencialidades que tiene un ejemplar para transmitir las características deseables a su descendencia. El comportamiento durante la tienta o lidia de los ejemplares, constituye el principal mecanismo que el ganadero posee para ejercer el control de la explotación (García *et al.* 2003).

Antiguamente, el hecho del ganadero acercarse a las vacas y ver la reacción del animal, realizaba un juicio acerca de la bravura. Comprobar la irritabilidad ante la presencia de cosas extrañas, servía al ganadero para catalogar, lo que él interpretaba como "bravura". Cuando se fueron formalizando las corridas de toros, éstas se convirtieron en espectáculo, y lógicamente,

había que controlar la bravura, pues por todo lo anteriormente expuesto, exigía una selección por parte del ganadero en los toros que criaba.

Hay constancia de unas pruebas comportamentales que seguramente fueron el inicio de lo que más tarde sería la prueba de "tienta" realizada por los ganaderos en sus explotaciones para la elección de los futuros reproductores. En estas primeras pruebas los ganaderos, después del herradero soltaban la becerra, en el cercado o corral donde la habían herrado, y previamente colocado un objeto, que bien pudiera ser un saco relleno de heno o paja, o incluso, un cesto de mimbres, observaban la intensidad de la acometida del animal, sacando de éstos, las conclusiones que le parecían más convenientes.

Durante la faena de "tienta" se realiza una evaluación de la bravura y acometividad de la res, cualidades indispensables para que el toro bravo pueda ser lidiado o utilizado como futuro reproductor. Todos los ganaderos de reses bravas coinciden que es la faena más importante realizada en el campo y que resulta imprescindible si se quiere controlar la bravura del toro, hasta tal punto que, la no realización de esta faena, puede dejar al ganadero sin un control de la bravura de su ganado.

No existe una escala prefijada o establecida para catalogar el mejor rendimiento del toro bravo. Es una prueba muy compleja y subjetiva, de la que hay que obtener manifestaciones individuales, porque cada toro es diferente en la acometida. Es una prueba de psicología experimental, que se realiza en animales jóvenes (principalmente en hembras futuras reproductoras de 2 años de edad), que no han desarrollado todo su poder mecánico.

La selección que el ganadero realiza en su explotación de ganado bravo se basa en los resultados obtenidos de los tentaderos. Los dos procedimientos que se emplean de forma más usual para evaluar la bravura en campo son (Purroy 1988): tentadero de hembras en plaza de tientas y tantadero de machos en campo abierto conocido como "acoso y derribo". A pesar de las dos modalidades existentes, la finalidad de la tienta es la misma, y no es otra que probar la resistencia al castigo de la puya, por parte del animal. No hay medidas determinadas ni exigencias en cuanto a la plaza de tientas. Únicamente son más pequeñas que las dedicadas a las corridas, y la forma no es siempre redondeada, pues esta circunstancia depende, por lo general, de las características que ofrezca el terreno donde el ganadero quiera ubicarla.

El primer aspecto a considerar a la hora de evaluar la idoneidad del toro para la lidia es el físico o morfológico, lo que en argot taurino se denomina "trapío". Cossio (1951) define el *trapío* como

"el conjunto de características del toro, de apreciación visual, que hacen juzgar de su aspecto, estampa y probables condiciones para la lidia". Para (Sánchez-Belda 1952) es la expresión plástica resultante de los rasgos proporcionados por cada una de las regiones corporales, asociados a los deducidos de la observación en conjunto de las características somáticas del animal de lidia. (Fernández 1959, 1962) dice que es una noción de conjunto de apreciación eminentemente subjetiva. (Cruz 1991) considera que nadie puede definir el *trapío* y añade que es una palabra acuñada para describir la condición morfotípica total de un toro que reúne secuencias de belleza y armonía corporal, sin defecto físico apreciable, que transmite sensación de poder, perfectamente aplomado y encornado, y con un expresivo patrón de conducta como corresponde a su estirpe genética; en definitiva, el *trapío* difícilmente se define sino que más bien se intuye. Para (Fraile 1995), el *trapío* en sí es el binomio "apariencia física-conjunto anatómico" donde armonía, peso y tamaño relacionan las partes con el todo.

El segundo factor a tener en cuenta en la lidia es la edad de los animales. El vigente Reglamento de Espectáculos Taurinos, Real Decreto 176/1992 de 28 de febrero (BOE 1992), establece que las reses destinadas a la lidia en corridas de toros habrán de tener de 4 a 6 años, y las destinadas a novilladas con picadores de 3 a 4 años (art. 46), pero esta distinción no es reciente. En la actualidad, los festejos de novillos siguen siendo minoritarios, aunque su número aumenta año tras año.

Debemos tener en cuenta que a lo largo de la historia de la tauromaquia no siempre se han lidiado los "toros" con la misma edad. Antiguamente, se lidiaban con 5 ó 6 años (Cossio 1951; Viforcós 1992; Domecq 1994), mientras que hoy la edad reglamentaria es de 4 ó 5. Fue en el reglamento de 1923 cuando se dispuso, por primera vez, que los toros podrían ser lidiados cuando tuvieran 4 años cumplidos (Cossio 1951). Esta disminución de edad ha sido acompañada por una reducción del peso mínimo exigido a los astados. Así, mientras que el reglamento de 1917 establecía un peso mínimo, según la época del año, de 525 ó 550 Kg. (García-Ramos 1981), el reglamento vigente sólo exige un peso de 460 Kg. para plazas de primera, 435 kg. para plazas de segunda y 410 Kg. para plazas de tercera (art. 47).

La "*bravura*" es definida por (Sanz-Egaña 1942) como un instinto defensivo o de liberación. Para Cossio (1951), es la conducta propia del toro fiero, de acometividad resuelta y con constancia en la acometida. Por su parte, (Sánchez-Belda 1954) señala que el concepto de *bravura*, en la práctica, es considerado sinónimo de "franca aptitud para la lidia", dejando de ser

una concepción fija e inmutable, para variar, a veces, hasta grandes extremos en función de la época. (Mira 1981) hace una descripción muy detallada de las cualidades comportamentales del toro ideal para la lidia, describiéndolo como un animal que presenta una salida alegre y pronta del chiquero, remata en los tres burladeros desde donde primero se le cita por los peones, dobla humillando y con recorrido al correrlo y torearlo con capa, acude pronto y desde largo al caballo en el tercio de varas, dejándose pegar sin dolerse al castigo y creciéndose ante éste en los tres puyazos, no se duele y mantiene la prontitud en banderillas y en la muleta y muere en los medios sin haber perdido ni un instante su condición de realmente bravo.

En el mismo sentido, (Nieto 1987) dice que las características principales de la bravura son: embestida con prontitud y repetición, pelea resuelta en el caballo, acudiendo de lejos y metiendo los riñones, sin dolerse en el tercio de varas ni durante el de banderillas, rectitud en el viaje de sus acometidas, tendencia a los medios y morir con la boca cerrada.

Según (Gaudioso *et al.* 1985), los patrones de comportamiento que, a juicio de los ganaderos, mejor reflejan la bravura son: acudir desde lejos al caballo del picador, crecerse ante el dolor, repetir de largo ante el caballo, acudir al cite en banderillas y embestir en todos los terrenos ante capote y muleta.

Para Domecq (1994), los factores positivos que influyen en la bravura son:

1. Fuerza, codicia, movilidad, prontitud, venir de largo.
2. Raza, casta, fiereza.
3. Fijeza, temple, galope, meter la cara, embestir derecho.
4. No dolerse, persistencia en el tiempo, con constancia o viniéndose arriba.

Por el contrario, los negativos serían:

1. Falta de fuerza, de codicia, de movilidad, tardo.
2. Falto de raza, distraído, trotón, andarín, sin casta y fiereza, pereza en la embestida.
3. Cara alta o no baja en la embestida, escarbar.
4. Colarse, dolerse, venirse abajo, desigualdad en la embestida, salirse suelto, "cangrejar".

En resumen, parece que la *bravura* depende de la interacción de numerosos factores (Fernández 1959; Madariaga 1966; Sánchez-Algaba 1979), variando la importancia atribuida a cada uno de ellos (la codicia para Fernández, (1959); la embestida “educada” o suave para Madariaga, (1966); la valentía para Domecq, (1994)).

Son muchos los factores que pueden determinar el comportamiento que exprese el toro durante la faena de tienta o durante la lidia en plaza. La mayoría de estos factores son de índole ambiental, pero también hay factores genéticos entre los que destaca la consanguinidad de los animales producto del sistema de cría cerrada que se practica en las ganaderías de reses bravas. Los factores ambientales que influyen en las características de bravura, toreabilidad y fuerza, pueden subdividirse en dos grupos:

- Los factores inherentes a las faenas de tienta o de lidia, como son el transporte a la plaza, el manejo previo a la lidia, la plaza (tamaño, ruedo, condiciones del terreno, etc.), el personal de la lidia (torero, picador y banderilleros) y el juicio de quien valora la nota de tienta o lidia (generalmente el ganadero).
- Los factores no inherentes a las faenas de tienta o de lidia, como son todos aquellos propios del entorno en el que se crían y viven los animales hasta el momento de sus lidias, como son la nutrición (condición de pastoreo y alimentación suplementaria), el clima, las enfermedades, la topografía y el manejo en general (Durán 1999).

Para (Castro 1999) los principales factores ambientales que pueden condicionar el comportamiento del toro bravo son:

1. **Edad, Tamaño y Peso del Novillo.** La mejor edad para someter a los animales a una prueba de “tienta” es entre los 2 y 2,5 años de edad, con objeto de que el novillo/a pueda aguantar las altísimas exigencias a las que es sometido durante esta faena. Para soportar estas exigencias la alimentación suministrada debe ser adecuada, pero sin llegar al sobrepeso ya que el animal puede asfixiarse durante la faena. Los novillos muy pequeños, débiles o de poco peso, no podrían aguantar el castigo al que son sometidos en esta faena. En el caso contrario, novillos muy desarrollados podrían dificultar esta labor, no solo por el riesgo que conlleva para los participantes, sino que puede equivocarse el juicio del ganadero al mezclar la bravura con poder físico. El ideal es el punto intermedio en el que el caballo, picador y el personal de a pie puedan con el novillo, exigiéndole al máximo y permitirle a este demostrar su bravura y clase.

2. **Condiciones Climatológicas.** La tienta es operación anual, realizándose principalmente en fecha invernal (meses de otoño e invierno), que ya están fuera de la temporada taurina. En climas cálidos se debe tentar a primeras horas del día o a últimas horas de la tarde, ya que si se realiza en horas donde el sol calienta más y la temperatura es alta, disminuye el rendimiento físico del novillo afectando su aptitud, enmascarando así, la apreciación real de su bravura. En climas fríos puede tentarse a cualquier hora del día, siendo lo ideal en las horas con mayor luminosidad y temperatura templada.
3. **El Caballo de Picar y el Picador.** El caballo del picador debe estar acorde con la edad y el peso de los novillos a juzgar, de manera que un caballo débil es un gran riesgo para el picador, pudiendo ocasionar un grave accidente. Por el contrario, un caballo excesivamente grande hace que el novillo no pueda manifestar al máximo la característica de bravura con la clase necesaria, al dificultarse la recargada, puesto que parecería una pared inamovible, y el puyazo, si no está bien medido por el picador puede causar al novillo daños cervicales que pasan inadvertidos, pero que tendrán efecto en la lidia con la muleta. El picador que se escoja para la faena de tienta debe ser ante todo un profesional, tener valor, saber montar (posición en la silla, equilibrio, soltura, mano suave con las riendas, uso de la pierna o ayudas que ordenan algún movimiento al caballo), agilidad, saber citar al toro y en qué momento con la voz y con el movimiento del caballo y saber medir al toro en el castigo. La colocación de los puyazos en el lugar preciso también es muy importante y deben rectificarse si no cae en buen sitio. Ya que los puyazos traseros traen consecuencias negativas en la faena de muleta, al igual que los puyazos caídos ya que afectan a las paletas con el consiguiente deterioro de la locomoción del novillo.
4. **El Torero.** Durante la faena de tienta, el torero debe saber que es el ganadero quien dirige la faena, por lo que debe seguir las órdenes respecto a la manera de efectuar la lidia del animal, el terreno en donde realizarla, las distancias a los cites y sobre todo saber medir la resistencia. En la tienta los matadores no torear para el público, lo deben de hacer de manera que el novillo le muestre las virtudes y defectos al ganadero, ya que no se trata de un lucimiento personal sino de profesionalismo en la ejecución de la faena de tienta.

5. **Consanguinidad y Depresión Consanguínea.** La mutación, selección y migración son las fuerzas responsables de producir cambios en las frecuencias génicas dentro de poblaciones de tamaño grande con apareamiento aleatorio. Cuando las poblaciones son pequeñas además de estas tres fuerzas, se considera una cuarta que puede cambiar la frecuencia génica y que se conoce como *chance*, *azar*, *proceso dispersivo* o *deriva genética*, la cual no es predecible en su dirección en cuanto al arrastre de genes favorables o desfavorables (Falconer 1989). La más importante de estas fuerzas es la selección, ya que permite al criador mejorar los rasgos específicos en sus animales para alcanzar las metas establecidas dentro de su explotación. El sistema de apareamiento escogido ejerce cierto control sobre la distribución de los cigotos de la población, por ejemplo, al aparear individuos con semejanzas fenotípicas o parecidos en su pedigrí puede aumentar la homocigosis (Legates *et al.* 1992). La consanguinidad aparece cuando se aparean animales emparentados, cuya consecuencia es el incremento de la homocigosis; en la descendencia resultante se produce una recombinación de genes de los ancestros comunes de cada uno de los progenitores, aumentando la posibilidad de que los loci de los hijos se vuelvan homocigóticos (Legates *et al.* 1992).

En las ganaderías de Lidia hay dos aspectos que influyen en el aumento de los niveles de consanguinidad de los animales. Los aspectos de origen, atribuidos a que los animales proceden de un reducido número de ganaderías fundadoras; y los aspectos de manejo, debido a que la mayoría de las ganaderías producen sus propios reemplazos, el apareamiento de animales relacionados con un ejemplar en particular, para mantener o incrementar las características del mismo en sus descendientes (*linebreeding*) y el reducido número de sementales. Además la relación del número de vacas por semental puede ser de 40 ó 50 a 1 (Lanfranchi 1992; Santa-Martina 2001). Todo ello son complicaciones de trabajar para mejorar un carácter, que conlleva el riesgo de perder variabilidad.

Según (Castro 2012), el incremento de la consanguinidad se ha producido por un aislamiento reproductivo, debido al manejo tradicional del sistema de producción del toro de Lidia; sobre todo por los métodos de selección orientados a la fijación de determinados caracteres, utilizando ganaderías cada vez más pequeñas y un reducido



número de encastes, algunos de los cuales han disminuido su presencia gradualmente, de acuerdo a las preferencias de la época.

Generalmente la consanguinidad se asocia a efectos negativos e indeseables debido a que en algunas especies o razas se ha observado una disminución en el rendimiento medio de algunos caracteres productivos (Burrow 1993; Falcão *et al.* 2001; Ruíz-Flores *et al.* 2006). Sin embargo, puede tener consecuencias favorables como es el caso de la prepotencia o el hecho de que la progenie de un semental sea muy uniforme y parecida con el padre; esto requiere de un buen programa de selección y con objetivos bien definidos. Hay que tener presente que la consanguinidad no mejora las cualidades ni empeora los defectos, lo que hace simplemente es fijar cualidades y también puede fijar los defectos. Por ello es de suma importancia la selección de los animales que van a actuar como reproductores. Y no sólo por su fenotipo, sino por su genotipo.

Una consanguinidad baja se produce cuando el grado más cercano de parentesco de los padres es de primos segundos, pero también vamos a encontrar apareamiento que se realizan entre animales más emparentados (entre hermanos completos o padres con hijos). Al cruzarse individuos emparentados la homocigosis tiende a aumentar en la progenie, siendo esta, la principal razón para los cambios genotípicos y fenotípicos relacionados con la consanguinidad (Legates *et al.* 1992). En general, se recomienda evitar o minimizar la consanguinidad en los animales, ya que además de producir un incremento del nivel de homocigosis, aumenta el riesgo de la aparición de efectos indeseables en el fenotipo, estado denominado como depresión por consanguinidad, que generalmente se asocia con afectaciones de la fertilidad y la longevidad y, en menor grado, con el desarrollo y las características productivas. La depresión por consanguinidad puede ser significativa si el nivel de consanguinidad se incrementa rápidamente. Cuando aumenta lentamente, es conveniente ejercer una fuerte presión de selección para descartar los reproductores con características indeseables o de pobre desempeño.

La consanguinidad solicita la utilización de una rigurosa selección, objeto de obtener ejemplares con el patrón deseado dentro de las metas de la ganadería, y para no incluir como reproductores los que presentan caracteres desfavorables. En los efectos negativos de la consanguinidad cabe resaltar:

- Aumento en la homocigosis.
- Mayor frecuencia de aparición de defectos letales y otras anomalías genéticas debido a la homocigosis de genes recesivos.
- Decadencia de caracteres tales como fertilidad, tasa de crecimiento, sobrevivencia o producción de leche, entre otros.

Entre sus beneficios, cabe destacar el hecho de que la consanguinidad se ha utilizado a lo largo de los años para la fijación de caracteres deseables. Basándose en este principio se han desarrollado y conservado razas de animales, y es este el caso de la de Lidia.

El objetivo de la producción del bovino de Lidia es la obtención del “toro perfecto”, de lo que cada ganadero cree que es el toro ideal. Por tanto, la selección en el ganado de Lidia es, en cierto modo, subjetiva y son los propios ganaderos los que intentan crear “un producto personal” a base de favorecer la aparición de características particulares en los animales mediante la elección de determinados ejemplares destinados para la reproducción. En los últimos años hay que destacar que ya se ha implantado en esta raza el Programa Oficial de Mejora Genética, tanto en su vertiente selectiva como conservacionista (García 2011), y consiste en identificar a los individuos portadores de los genes más beneficiosos para los caracteres de interés y utilizarlos como reproductores para que los transmitan a sus descendientes. Para evaluar si el fenotipo de un animal es o no un buen reflejo de los genes que porta (valor o mérito genético), se calcula la heredabilidad de ese carácter (González *et al.* 1994).

Así, en la explotación del ganado de Lidia se realizan tres tipos de selección: genealógica, morfológica y funcional (Gaudioso & Riol 1996). Según (Lomillos 2012), para la selección genealógica, el ganadero conoce y registra sistemáticamente las líneas o familias que conforman la base del patrimonio genético de su ganadería, así como los resultados de la descendencia de cada generación. La selección genealógica es más drástica y excluyente en los machos. Cada ganadería tiene definidas sus preferencias morfológicas, dependiendo del encaste al que pertenezca o los gustos del ganadero. Las exigencias con los machos siguen siendo mayores que con las hembras. Se selecciona particularmente todo lo referente a encornaduras, conformación del cuello y morrillo, alzada, etc. (Cabrera 2012).

La selección funcional consiste en medir el carácter bravura de cada animal, aunque cada ganadero entiende, de una forma muy subjetiva, el significado de este término y para evaluarla se realizan una serie de pruebas tanto a hembras como a machos tal y como se ha mencionado anteriormente (Gaudioso & Riol 1996). Hay que señalar que desde hace más de cinco siglos esta raza sólo se ha seleccionado desde el punto de vista fenotípico para la combinación de caracteres relacionados con la bravura, la fijeza, la fuerza y la resistencia. A la dificultad de evaluar de forma precisa los caracteres comportamentales de esta raza, se le une el hecho de la cría consanguínea que practica la mayoría de los ganaderos de esta raza, lo que hace que sea difícil encontrar relaciones genéticas entre animales de distintas ganaderías, dificultado la conexión genética y consecuentemente la valoración genética interganadería (Silva *et al.* 2006).

En el año 2011 (tal y como se mencionó previamente) se aprueba por parte de MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino) un Programa de Mejora Genética conjunto para las cinco Asociaciones de Ganaderos reconocidas dentro de esta raza. Los actuales criterios de selección se fundamentan en la información genealógica o de pedigrí más la valoración fenotípica de los candidatos. La valoración fenotípica se compone del comportamiento o conducta durante la tienta y la lidia.

Para la planificación y ejecución de un Programa de Mejora, es fundamental la estimación fiable de los parámetros genéticos de heredabilidad ( $h^2$ ) y las correlaciones genéticas. Pero el primer problema importante con el que nos encontramos a la hora de determinar los parámetros genéticos de variables comportamentales es poner a punto un control de rendimientos objetivo para esta raza. En este sentido, lo ideal sería que todos los caracteres tanto comportamentales como funcionales a evaluar de cada animal fueran valorados desde el mismo punto de vista y siguiendo las mismas pautas, es decir, valorando los mismos caracteres y con las mismas exigencias. Es decir, lo ideal es disponer un sistema objetivo y fiable para realizar el control de rendimientos en todas las ganaderías de bovino de lidia. No obstante, los pocos trabajos que han realizado una estimación de parámetros de los caracteres comportamentales han utilizado las evaluaciones subjetivas y no estandarizadas que utiliza cada ganadero en su propia explotación (González *et al.* 1994; Silva *et al.* 2006; Sartori & Mantovani 2010), con lo cual se arrastra un error en la estimación de estos parámetros y un fuerte error. Además dada la baja conexión genética entre las ganaderías, la mayoría de estos trabajos han tenido que realizar

una valoración genética intraganadería y consecuentemente la comparación de los resultados conlleva un fuerte error.

Cualquier carácter comportamental es un fenotipo bajo el cual subyace un genotipo que la explica (en mayor o menor medida dependiendo de cómo sea la interacción de esos genes con el ambiente). Lo difícil en todo lo que tiene que ver con la explicación genética de la conducta, es definir el fenotipo. La conducta es algo continuo, variable y difícil de definir objetivamente por ello cada observador puede diferir en la interpretación del comportamiento.

Hasta hace una década, de manera rutinaria, las notas de tienta y lidia no eran registradas por las ganaderías. Sin embargo, el registro genealógico ha sido escrupuloso y existen ganaderías con más de un siglo de registros de pedigrí (Ramírez-Valverde *et al.* 2004; Domínguez-Viveros *et al.* 2005). La disponibilidad de estos recursos, registros del comportamiento bravo, junto a los registros genealógicos en las ganaderías han permitido el establecimiento de evaluaciones genéticas (Núñez *et al.* 2004). No obstante, actualmente son pocos los ganaderos que hayan diseñado instrumentos que permitan reducir la subjetividad que existe en la evaluación y selección del ganado bravo, dada la gran subjetividad que conlleva aspectos tan importantes en el toro de lidia como son la bravura, la toreabilidad y el desempeño físico (Calero *et al.* 1997). En primera instancia, una de las muchas dificultades a las que se enfrenta el ganadero es la demora para apreciar los resultados de los reproductores (pruebas de progenie), ya sean positivos o negativos, pues tardan en constatarse algunos años, con todos los riesgos que ello conlleva. Otra dificultad, es que la prueba de la tienta es irreplicable debido a que en ella el animal aprende una serie de comportamientos que invalidan cualquier prueba posterior (Popelín 1966).

La tienta o lidia de un ejemplar es, por lo tanto, un proceso único que no puede prolongarse más allá de lo que dura la energía del animal. Además, durante la tienta todo sucede de manera muy rápida, siendo un proceso que no se puede detener ni posponer, situación que hace difícil el desagregar y apreciar detalladamente el comportamiento de las reses. Al final del tentadero debe decidirse si el destino del animal es la reproducción, la venta a otra ganadería o el matadero (García *et al.* 2003). Por ello, se hace imprescindible mejorar el método de evaluación empleado, de manera que el ganadero pueda registrar de forma detallada las observaciones realizadas durante los tentaderos, corridas de toros y de todo cuanto acontece a lo largo de estos procesos, para generar información más precisa (Vallejo *et al.* 2001). El video

constituye una herramienta de suma importancia en la selección, pues la filmación total y sin cortes del juego de cada uno de los ejemplares tentados o lidiados permite un análisis más detenido del comportamiento, aunque la medida de los caracteres etológicos sea compleja (Calero *et al.* 1997).

Tradicionalmente, para valorar el comportamiento del animal el ganadero utilizaba un sistema de evaluación sencillo, en el cual se calificaba al animal durante las fracciones básicas del tentadero, observándose primero el desempeño con el caballo del picador y el juego en la muleta. La evaluación clásica realizada por el ganadero presenta muchos limitantes sobre todo desde el punto de vista del control de rendimientos en el marco de un esquema de selección genético. Si un animal es observado por dos evaluadores diferentes pueden existir amplias diferencias en la calificación final aunque dichos evaluadores sean experimentados (González, 2005). Además, al ser este método un sistema global y abierto, existen grandes probabilidades de pasar por alto aspectos importantes a evaluar, generándose un registro incompleto, y además, en la mayoría de casos los registros se llevan de manera manual en donde el proceso de búsqueda y procesamiento de información no cuantitativa registrada resulta dispendiosa si se compara con un proceso sistematizado (Cañón *et al.* 1998). A toda esta problemática hay que añadir los sesgos que se pueden producir a la hora de evaluar ya que son muchos los ganaderos que con el transcurrir de los años sufren un proceso de endurecimiento selectivo o de relajación (González, 2005). Este proceso de evaluación también está sujeto a otros componentes subjetivos, como por ejemplo, si en un mismo tentadero la nota otorgada a un ejemplar tentado en quinto lugar puede verse influenciada por el comportamiento presentado por los cuatro anteriores. Si los comportamientos de los animales anteriores han sido pésimos, el animal regular podría puntuarse como bueno, pero si por el contrario los comportamientos previos han sido excelentes, un buen animal podría clasificarse como regular (García *et al.* 2003).

En definitiva, está constatado que el sistema tradicional por el que los ganaderos evalúan y registran el comportamiento de las vacas durante la tienta y de los toros durante la lidia presenta numerosas limitaciones (García *et al.* 2002; García *et al.* 2003), siendo necesario cambiar el sistema de clasificación tradicional por un sistema estandarizado que presente una mayor confiabilidad en los datos, debido a que tanto la naturaleza de la información que se busca, como la manera empleada para recolectar esta información, sean más homogéneas. Adicionalmente, dicha información, resulta operativa en la medida en que es cuantificable, fácil

de informatizar y susceptible de someter a cálculos numéricos y estadísticos, permitiéndole al ganadero desarrollar modelos estadísticos para definir fenómenos tan complejos como la bravura, o la falta de fuerza en los animales. Con esta información puede construirse a corto plazo un sistema de indicadores estadísticos sencillos que permitan evidenciar la evolución de la ganadería en el tiempo (Calero 2008). Así, en los últimos años se han puesto a punto distintas metodologías para la evaluación del comportamiento del toro bravo, intentando ajustar las evaluaciones a una escala jerárquica de (Domínguez-Viveros *et al.* 2008; Almenara-Barrios & García 2011).

En el caso de la metodología propuesta por Domínguez *et al.* (2008), las evaluaciones del comportamiento del toro se ajustan a una escala de jerarquía de nueve clases que, con fines aritméticos, se convierte a una escala de calificación numérica que va de 1 a 9 puntos. La nota de tienta se compone de dos partes. La primera es la tienta a caballo (TC), que analiza el comportamiento del animal al embestir al picador; que sobre su caballo debidamente cubierto, pica a los animales con el propósito de despertar el instinto de bravura y en consecuencia demuestren seguir peleando y su resistencia al castigo. La segunda evaluación es la tienta a pie (TP). Esta nota permite analizar el comportamiento del animal hacia el torero, evaluando sus movimientos como puede ser la altura de la cabeza al embestir así como la fuerza con la que inicia y termina la embestida (Domínguez-Viveros *et al.* 2008). La nota de lidia comprende el comportamiento del animal cuando está en la plaza de toros. Tanto la nota de lidia, como la nota de tienta, se divide en a caballo y a pie. La LC comprende el primer tercio de la corrida (o tercio de varas) donde un “picador” del matador en turno, mediante puyas castiga al animal con la finalidad de reducir sus fuerzas. La LP se ubica en el último tercio de la corrida y es donde se efectúa el duelo entre el toro y el torero. Al final de la lidia a pie el juez de plaza decide si el torero le da muerte al animal o si éste es indultado. Si el toro recibe el indulto, regresa a su ganadería para servir como semental (Domínguez-Viveros *et al.* 2008).

Otros autores como Almenara-Barrios y García (2011), han diseñado una *Escala de Evaluación de la Bravura para Bovinos de Lidia* (EBL-10) con el objeto de evaluar cuantitativamente una variable subjetiva e intangible como es la bravura del bovino de lidia. Es decir, concibieron la bravura del bovino de lidia como un fenómeno multidimensional que engloba 10 *dimensiones comportamentales*: movilidad, acometividad, fijeza, embestida al caballo, embestida a los engaños, fiereza, nobleza, fuerza, transmisión y crecerse. La *Escala de Evaluación de la Bravura para Bovinos de Lidia* (EBL-10) es una *escala heteroadministrada de estado* (escala de

“aquí y ahora”), que evalúa la situación actual del fenómeno (bravura de un bovino de lidia concreto durante la tienta o la lidia). Cada una de las variables o dimensiones comportamentales se corresponde con uno de los 10 ítems de la escala. El tipo de escala utilizada es de *ponderación numérica*, consistente en un listado de comportamientos (dimensiones de la bravura a los que se asignan números que representan un gradiente de calificación) (Pardo de Vélez & Cedeno 1997). En cada ítem aparecen dos descriptores opuestos representando cada uno de los extremos de dicha dimensión. Además de la descripción nominal, en la escala se refleja gráficamente la intensidad a través de un análogo visual reforzado (Bulbena *et al.* 2000).

Cuando la AEGRB puso en marcha su Programa de Mejora fue preciso implementar una ficha de control de rendimientos comportamentales que subsanara todas las deficiencias de las metodologías utilizadas con anterioridad, ya que la calidad de las evaluaciones genéticas depende en gran medida de la veracidad de los datos recogidos y en la calidad de los tasadores (Janssens & Vandepitte 2004; Sánchez *et al.* 2013). En este sentido, se diseñó una ficha de calificación lineal estandarizada del comportamiento del bovino de Lidia (ficha CLEC) que ya ha sido descrita en el 3º artículo que integra la presente Tesis Doctoral (Pelayo *et al.* 2016a). Como ventaja fundamental de la ficha CLEC se puede destacar su objetividad, ya que todos los toros y vacas se valoran siguiendo un mismo criterio (método estandarizado), lo que permite su tratamiento estadístico posterior para su utilización en la obtención tanto de “animales mejorantes para la lidia”, como de herramientas para los ganaderos que pretendan eliminar en la descendencia de sus animales aquellos defectos comportamentales que aprecien en sus toros y/o vacas. La validación de esta ficha de calificación llevó a cabo la evaluación de los calificadores que utilizan la ficha CLEC, usando dos parámetros: la *reproducibilidad* y la *repetibilidad*. Valores elevados de estos parámetros son indicativos de que el procedimiento de calificación ha sido adecuado. La *reproducibilidad* ha alcanzado en todas las variables valores superiores al 85%. Se consideran valores adecuados de *reproducibilidad* aquellos que son los superiores al 80% (Sánchez *et al.* 2013) y por consiguiente todas las variables de la ficha CLEC cumplen este requisito. Para el parámetro de *repetibilidad* también todos los valores fueron altos y superiores al 65%.

Recientemente, las evaluaciones genéticas se han implementado en ganado de Lidia, donde se han reportado estimaciones de parámetros genéticos para las características de agresividad, bravura y movilidad en ganaderías españolas (Silva *et al.* 2006). Los valores de  $h^2$  para estas

características han oscilado entre 0,29 y 0,36 e indican que la selección tradicional o empírica a la que han sido sometidos los animales ha sido efectiva (Zamora 2008).

El que no exista muchas referencias previas del estudio de la genética del comportamiento del toro en la Lidia puede ser atribuible a la existencia de una considerable variación metodológica para la evaluación de la conducta (Adamczyk *et al.* 2013). En las referencias en las que encontramos estimación de heredabilidad para rasgos comportamentales en bovino de Lidia, los valores oscilan entre moderados a altos. Por ejemplo, para aquellas razas de ganado seleccionado principalmente para la docilidad como son las razas de carne Limousin o Brahman, las estimaciones del valor de heredabilidad variaron entre 0,11 y 0,49 (Le Neindre *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 2014). Al contrario, para aquellas razas seleccionadas por su bravura, como es la raza de ganado Lidia, las estimaciones del valor de heredabilidad oscilan entre 0,29 para el carácter de movilidad y 0,36 para el carácter de *agresividad* (Silva *et al.* 2006). En este sentido, las heredabilidades obtenidas para las variables analizadas en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral están en un rango entre 0,13 y 0,41, similar al obtenido por otros autores. Las  $h^2$  estimadas para los caracteres comportamentales frente al caballo durante la faena e tienta en hembras en un estudio realizado en la ganadería de Ernesto González Caicedo (Calero *et al.* 1997) fueron muy bajas (0,0-0,15), siendo el carácter con una  $h^2$  más alta, el *humillado* (0,14). En el anterior estudio, los valores de  $h^2$  estimados para los caracteres frente al caballo han alcanzado valores medios (0,26-0,37), perteneciendo las  $h^2$  más altas a los caracteres *recargar al caballo* y *no dolerse al caballo*. Si comparamos la  $h^2$  del carácter *prontitud al caballo* (0,34) obtenida en el anterior trabajo, con la estimada en nuestro estudio ( $h^2=0,41$ ) observamos que nuestra estima es superior en 7 puntos.

En el otro estudio en bovino bravo, realizado por (Calero 2008), solo tiene en cuenta dos caracteres para evaluar el comportamiento de la res frente al caballo de picar: *prontitud en varas* y *recargar en varas*. La  $h^2$  obtenida en *prontitud en varas* fue de 0,15, inferior a la obtenida en nuestro estudio (0,41). Esta notable diferencia puede deberse a que en el estudio de (Calero 2008) sólo se han valorado animales de una única ganadería, estando muy condicionados estos valores a las relaciones de parentesco de los animales evaluados.

Los valores de  $h^2$  para las variables de comportamiento evaluadas en la fase de muleta se encuentra en un rango medio, que oscila entre 0,13 (para la variable *número de caídas en la*



*muleta*) y 0,33 (para la variable *fijeza en la muleta*), lo que evidencia que la selección para este tipo de caracteres puede ser exitosa en un Programa de Mejora Genético.

En el trabajo de (Silva *et al.* 2002), la variable con menor valor de  $h^2$  fue la *prontitud en la muleta* con un valor de 0,07. En cambio en nuestro trabajo, la variable con menor  $h^2$  fue *número de caídas*.

(Cañón 2014), argumenta que aquellos caracteres que superan el umbral del 25% de  $h^2$ , los podemos considerar como necesario para que podamos plantear estrategias de selección con éxito (teniendo en cuenta los factores limitantes de tamaño de ganaderías). Todas las  $h^2$  de nuestro estudio superan dicho umbral citado por Cañón excepto dos (*momento de fatiga* con  $h^2=0,24$  y *número de caídas* con  $h^2=0,13$ ).

La comprensión de la relación entre los rasgos de comportamiento es muy informativa, para el procedimiento correcto de un programa de cría y para el desarrollo de estrategias de mejora mediante la definición de los criterios de selección correctos. En este sentido, la mayoría de las correlaciones genéticas obtenidas en el presente estudio, durante el tercio de varas, fueron altas y positivas, de acuerdo con la encontrada para otros autores para rasgos similares (Silva *et al.* 2002, 2006; Almenara-Barrios & García 2011). Al apreciar los resultados de las correlaciones genéticas entre las diferentes variables en el comportamiento frente al caballo vemos como en primer lugar todas las correlaciones genéticas poseen un valor de correlación significativo y positivo. Todos los coeficientes de correlación genética, se consideran medios-altos, siendo la correlación genética entre *humillado en caballo* y *pelea en caballo* la más alta, con valor de 0,89.

Si observamos las correlaciones fenotípicas existentes entre los caracteres de comportamiento frente al caballo, comprobamos que también son de signo positivo y de rango medio. Los valores más bajos en la estimación de las correlaciones fenotípicas frente a las genéticas se explican por el hecho de la gran influencia de los factores ambientales en los caracteres de comportamiento, que van implícitos en el cálculo de las correlaciones fenotípicas mientras que en las genéticas estos efectos ambientales se han eliminado. La correlación fenotípica más alta la podemos encontrar entre las variables *fijeza en la muleta* y *recorrido en la muleta* con un valor de 0,78.

Al igual que en nuestro estudio, (Calero *et al.* 1997) determina que las correlaciones (fenotípicas y genéticas) entre las características involucradas en el tercio de varas durante la

lidia son medias-altas, variando de 0,06 a 0,28 en las variables de tienta y de 0,60 a 0,50 en las variables estimadas durante la lidia. Es decir, desde el punto de vista comportamental, la res que empuja bien en el caballo, tampoco se duele al castigo y debe sacarse con quite, ocurriendo lo contrario con los toros mansos.

También la mayoría de las correlaciones genéticas en la fase de muleta, obtenidas en el trabajo presentado en el capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral tienen valores positivos, al igual que ocurría con las correlaciones genéticas de las variables comportamentales del tercio de varas. La correlación genética que ha obtenido el valor más bajo (0,01) se ha producido entre los caracteres *fijeza en la muleta* y *número de caídas*. Por el contrario, la correlación genética más alta (0,90) se ha encontrado entre los caracteres *fijeza en la muleta* y *prontitud*. Lógicamente un animal caerá mayor número de veces cuando la fatiga se produzca con mayor precocidad. En nuestro trabajo, obtuvimos una correlación positiva de 0,60 entre las variables *fatiga en la muleta* y *número de caídas*.

La *fijeza al engaño* es una variable que está ligada desde el punto de vista genético al resto de variables, pero en especial a la de *recorrido en la muleta* (0,81). Los toros que manifiestan esta característica en un alto grado generalmente terminan desplazándose muy bien ocurriendo todo lo contrario con los toros distraídos (Calero *et al.* 1997; Calero 2008). Estos mismos autores también encontraron correlaciones altas entre la *fijeza al engaño* y el *fondo* (variable similar en nuestro estudio al *momento de fatiga*), obteniendo valores fenotípicos y genéticos de 0,66 y 0,78 respectivamente en el trabajo de (Calero *et al.* 1997) y de 0,53 y 0,66 según Calero, (2008).

Para Calero (2008), las variables consideradas tradicionalmente como responsables en gran medida de la toreabilidad son las de *fijeza*, *recorrido* y *humillado en la muleta*, obteniendo valores moderados tanto de correlación genética como de correlación fenotípica entre este grupo de variables. En nuestro estudio los valores de correlaciones genéticas y fenotípicas entre *humillado en la muleta* y *fijeza en la muleta* ha sido de 0,79 y 0,67 respectivamente; y entre *humillado en la muleta* y *recorrido* fue de 0,85 y 0,70 respectivamente.

Una de las correlaciones más estudiadas por los autores es la *prontitud*, en el tercio de varas y en la fase de muleta. En nuestro estudio tanto la correlación genética (0,74) como la fenotípica (0,53) son de magnitud alta. Sin embargo, (Calero *et al.* 1997), determinaron un valor promedio para esta correlación fenotípica de 0,34. Para estos autores el toro durante el primer tercio de la

lidia se encuentra “intacto”, ocurriendo todo lo contrario en los dos restantes donde el toro esta mas aplomado después de su encuentro con la vara. Así mismo, determinaron diferentes valores para las correlaciones genéticas entre los caracteres de *prontitud* en banderillas y en muleta (0,58) y entre muleta y tercio de varas (0,21), aludiendo que tales diferencias se atribuyen a que los genes responsables de estas características deben estar ligados a otros relacionados con resistencia y fuerza. En un estudio posterior realizado por el mismo autor (Calero 2008), el coeficiente de correlación genético entre las variables *prontitud en el caballo* y *prontitud en la muleta* fue de 0,72, siendo la correlación fenotípica de 0,40. La correlación genética entre la *prontitud en el caballo* con la variable *recorrido en la muleta* también ha mostrado un valor alto (0,57), similar a los determinados por Calero (2008) (0,61). Destacar que también hemos obtenido valores coincidentes con (Silva *et al.* 2002) para las correlaciones genéticas existentes entre el *momento de fatiga* con la *distancia máxima de arrancada* (-0,38) y con la *prontitud en el caballo* (-0,17) siendo ambas de rango moderado y negativo.

Por último reseñar que en nuestro trabajo (Pelayo *et al.* 2016a) se han propuesto tres índices genéticos a partir del análisis de componentes principales, de acuerdo con los criterios de selección de la raza bovina de Lidia. Teniendo en cuenta que el número de componentes a retener tienen que tener un valor propio superior a 1 y un porcentaje total de variabilidad mínimo del 80 %, podemos observar en la tabla 3 del trabajo de Pelayo *et al.* (2015) como los valores propios de cada componente son mayores a 1, al igual que el porcentaje total de varianza retenida tiene un valor superior al 80%, siendo dicho valor en concreto del 88,38%. Es de destacar como el componente número 1 posee el valor propio más alto (6,94) corroborando este dato que es el componente que más porcentaje de variabilidad aporta (57,81 %) al porcentaje total de varianza retenida.

El primer factor incluye nueve variables y se relaciona con la “*bravura*”: *prontitud*, *velocidad durante la acometida*, *humillado en caballo y pelea* (en el tercio de varas y caballo) y *fijeza al engaño*, *prontitud*, *velocidad de acometida*, *humillado* y *recorrido* (en el tercio de muleta). Este componente está en concordancia con las características definidas en el componente sintético PCA asociado con la agresividad y reportado previamente por (Almenara-Barrios & García 2011). El segundo componente incluye sólo tres caracteres (*prontitud en el tercio de varas* y *momento de fatiga* y *número de caídas*) y está relacionado con la “*fuerza*” o con la capacidad del toro para resistir durante la lidia. El tercer componente está relacionado con la “*movilidad*” e

incluye los rasgos relacionados con el movimiento (*distancia de arrancada, prontitud, velocidad de acometida y número de caídas*).

Autores como Cruz (1991) y Domecq (1994) consideran que la *bravura* supone una manifestación de fuerza y movilidad del animal, de modo que mediante la fuerza el toro mantiene la embestida y merced a su movilidad esa respuesta será repetitiva, con decisión y grandes dosis de "nobleza". Esta facilidad para la lidia, esta "suavidad", esta "embestida educada" en un toro bravo exige un paso más que haría al toro "noble". Si pasamos a intentar definir la "*nobleza*" como un carácter comportamental del toro bravo la mayoría de autores (Sánchez-Algaba 1979; Mira 1981; Nieto 1987; Sánchez 1988; Domecq 1994) utilizan el término como sinónimo de "suavidad" y "facilidad para el toreo", contraponiéndolo a "bronquedad" o "defenderse". Se podrían considerar como toros nobles a aquellos animales cuya lidia está exenta de peligro incontrolado para el matador. Así, un toro sería más noble cuanto mayor sea el tiempo de la lidia durante el cual manifiesta estas pautas etológicas.

Posiblemente una de las mejores definiciones desde el punto de vista etológico del toro bravo es la realizada por (Sánchez 1988). Para este autor el "toro ideal" para la lidia es aquél que además de bravo es noble, y ambas características se asocian en la justa medida para que el público aprecie un cierto peligro. Es decir, es un animal de ataque decidido e inmediato y de elevada bondad y suavidad, el animal que transmite sin plantear una lidia peligrosa. En este sentido, los patrones de comportamiento que debe presentar un toro apto para la lidia son: acudir de largo y humillar en la muleta, pasar bien, repitiendo los pases con rapidez y sin parada (codicia), humillar en el caballo, metiendo los riñones y creciéndose ante el dolor y embestir en todos los terrenos. Así mismo, el toro bravo no deberá cabecear en el caballo, derrotarse en la muleta, tardar en los pases, huir de la muleta y presentar querencia.

El disponer de estos tres índices genéticos (*bravura, movilidad y fuerza*), nos va a permitir seleccionar animales con un alto grado de toreabilidad que se adapten al prototipo de "toro ideal para la lidia" definido por la mayoría de los ganaderos, críticos taurinos, público y toreros.

#### **4.3 EL TORO BRAVO DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA PRODUCCIÓN DE CARNE DE CALIDAD**

Podemos considerar al toro bravo como una especie genuinamente española, que se ve influenciado por el medio ambiente, al cual lo han llevado a vivir, determinando así en éste, su

hábito temperamental. En este medio ecológico el hombre es el principal responsable como copartícipe del ecosistema, lo que determina que el toro de lidia responda a todos aquellos estímulos, para él, extraños, manifestando así su bravura o comportamiento, cuando el hombre lo torea. No obstante, los ganaderos españoles crearon la raza de Lidia, con los mismos procedimientos zootécnicos que han sido aplicados en otras razas: el cruzamiento y la consanguinidad. Se trata pues de la aplicación de técnicas genéticas empíricas desde hace más de 250 años, que han permitido disponer de animales con un comportamiento característico diferenciado del de los animales bravíos de origen, para lo que se han empleado pruebas funcionales de campo (acoso y derribo y retienta) y observación del comportamiento en plazas de toros.

Aunque la mayor parte del esfuerzo que el ganadero realiza en la cría de la raza de Lidia se dirige hacia la búsqueda de “la casta” y de la bravura del toro, cada vez más, el valor económico de la carne es fundamental en la cuenta de explotación de este tipo de ganadería. Por ello, con la intención de mejorar la rentabilidad de la explotación ganadera, es muy interesante examinar la posibilidad de mejorar las características cárnicas, a la vez que los aspectos comportamentales y funcionales relacionados con el espectáculo taurino (bravura, nobleza, trapío, etc.). Finalmente, se sabe que el ganado de Lidia es considerado el máximo exponente de la cría extensiva (Purroy 2003), propio de una raza de gran rusticidad capaz de adaptarse y aprovechar todo tipo de terrenos, incluso los de climatología extrema (Sánchez *et al.* 1980). La mayor densidad de esta raza se ubica en zonas de la dehesa española, jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la biodiversidad. Recordar que España, además de poseer el patrimonio genético más variado e importante de esta raza, es el primer país productor de ganado vacuno de Lidia (Cañón 2006).

Dada la importancia que adquiere hoy día la calidad sensorial y la calidad dietética de la carne, se están realizando numerosas investigaciones para obtener datos sobre el nivel de ternura y la infiltración grasa que posee la carne del toro de Lidia (Beriaín *et al.* 2011). Aunque el concepto de calidad es muy complejo, existen diversos factores que afectan, principalmente, a la percepción del consumidor: el color, la jugosidad, el sabor y la ternura. Esta última es la característica más valorada por el consumidor (Love 1994; Boleman *et al.* 1997) y depende principalmente de la degradación de las fibras musculares durante el proceso de maduración *post mortem* de la carne producida por el sistema de las calpaínas (m-calpaína y  $\mu$ -calpaína) que son cisteínas proteasas dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  (Ciobanu *et al.* 2002; Frisch & Rodríguez

2002). De este sistema enzimático forma parte también un inhibidor específico denominado calpastatina, que en el caso de los bovinos, se ha demostrado con estudios sobre cuantificación de niveles *post mortem* de este inhibidor que afecta a la terneza (Koochmaraie 1996; Cong *et al.* 1998; Morton *et al.* 1999).

De la misma forma, el contenido de grasa intramuscular influye en la aceptabilidad de la carne por parte del consumidor, especialmente por sus efectos positivos sobre la jugosidad y el sabor. Niveles moderados de grasa intramuscular, uniformemente distribuidos a través de la carne, proporcionan un buen sabor y jugosidad, en contraposición a la carne que no posee dicho veteado que es generalmente seca y carente de sabor (Beriaín *et al.* 2011). El gen DGAT codifica a la diacilglicerol o-aciltransferasa, enzima fundamental en la síntesis de triglicéridos, que además de estar vinculada a la producción de leche y a la cantidad de grasa en la misma, está relacionada con la deposición de grasa en otros tejidos como puede ser el muscular (Thaller *et al.* 2003).

En la actualidad el hecho de que se haya secuenciado prácticamente en su totalidad el genoma bovino, ha permitido intensificar los estudios tendentes a localizar y secuenciar los genes involucrados en la síntesis de las proteínas y enzimas responsables de la calidad de la carne. Así, hoy día ya están localizados y secuenciados algunos de los genes responsables de la maduración de la carne. El gen de la calpastatina se localiza en el cromosoma bovino 7 (Kappes 1999), mientras que el de la  $\mu$ -calpaína se localiza en el cromosoma 29 (Smith *et al.* 2000). De la misma forma ya se han encontrado polimorfismos y evidencias directas de su asociación con la terneza de la carne, tanto en el caso de la calpastatina (Nonneman *et al.* 1999; Barendse 2002; Casas *et al.* 2006) como de la  $\mu$ -calpaína (Page *et al.* 2002; White *et al.* 2005). Así, se ha determinado que el gen que codifica a la subunidad mayor de la  $\mu$ -calpaína (CAPN1) es uno de los principales genes responsables, de la terneza de la carne (Casas *et al.* 2000; Smith *et al.* 2000), estando descritas al menos dos mutaciones localizadas en los exones 9 y 14 que determinan una sustitución de aminoácidos en la proteína respectiva.

Asimismo, el gen que codifica la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1) se localiza en el cromosoma 14. Algunos estudios han descrito hasta 3 mutaciones en este gen, asociados a mayores depósitos de grasa intramuscular (Thaller *et al.* 2003).

Como ya hemos dicho, la mayoría de los esfuerzos realizados en la cría del bovino de Lidia, se centra en la búsqueda de la bravura, y los animales que no poseen estas características

comportamentales, son descartados. En estos casos, el valor económico de la carne es esencial para el ganadero de lidia. La carne de los animales que han sido “excitados” tiene una calidad inferior a la de los animales más dóciles, según lo evalúan las pruebas de comportamiento realizadas por (Haskell *et al.* 2014).

Una estrategia interesante para mejorar la rentabilidad de la explotación sería evaluar la posibilidad de mejorar las características de la carne, ampliar los criterios de selección de la raza bovina de Lidia y buscar usos alternativos de una raza principalmente criada en sistemas extensivos, que pudiera proporcionar una fuente dietética orgánica y saludable. Dado que la calidad sensorial y nutricional de la carne es cada vez más importante, se han realizado recientemente estudios relacionados con este tema en el ganado de Lidia (Beriaín *et al.* 2011; Horcada *et al.* 2012).

El estudio de polimorfismos relacionados con la calidad de la carne es un ejemplo de la tecnología más usada para predecir rasgos como la ternera o el grado de infiltración grasa. Actualmente, distintos estudios han encontrado nuevos polimorfismos de estos genes que no estaban presentes en las razas analizadas (White *et al.* 2005; Avilés *et al.* 2009). Este hecho es de gran trascendencia ya que exige que se analice el polimorfismo de estos genes en cada raza y se compruebe la asociación existente con la ternera de cada uno de los fenotipos (SNP).

En esta Tesis, se presentan los datos obtenidos tras analizar las frecuencias de varios polimorfismos relacionados con la calidad de la carne (CAPN1 y CAST, marcadores íntimamente asociados con la ternera y el DGAT1, relacionado con la grasa intramuscular) en los animales de Lidia así como en algunos de sus encastes.

Los resultados de este estudio mostraron que la raza de Lidia presenta una alta frecuencia de los alelos previamente asociados con carnes más tiernas y de mayor contenido en grasa (Pelayo *et al.* 2016b). Sería muy interesante realizar una búsqueda en profundidad de nuevos polimorfismos en estos genes relacionados con la calidad de la carne y de la misma forma realizar un análisis de asociación entre los polimorfismos encontrados y los rasgos de interés económico en la raza de Lidia.

Con la situación de crisis que está viviendo actualmente la ganadería de Lidia, son de gran importancia los estudios encaminados a evidenciar las cualidades cárnicas de la raza de Lidia dentro de un contexto de cría en libertad en dehesa, con una alimentación a partir de pastos naturales y bellota y con un manejo ganadero que permite a los animales realizar un ejercicio

físico que repercute en las características organolépticas de la carne. En este sentido es de especial interés trabajos que además complementen y correlacionen la información fenotípica con el genotipo de los animales. Es decir, que evidencien la relación entre marcadores genéticos (CAPN1, CAST y DGAT1) con la ternura de la carne o con su perfil lipídico, con el fin último de realizar una selección genética en los animales de la raza para la mejora cárnica de la misma.





# CONCLUSIONES





## 5. CONCLUSIONES - CONCLUSIONS

### Conclusiones del CAPÍTULO I

#### **Artículo 1. *Animal Genetics*, 2015. 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278**

- 1) Podemos considerar a la raza bovina de Lidia como una agrupación de razas de diferentes orígenes. El especial objetivo de cría (selección por el comportamiento bravo) y reproducción del ganado de Lidia (apareamientos consanguíneos dentro de subpoblaciones), así como el origen diverso de sus cinco castas fundacionales han contribuido a proporcionar la gran variabilidad genética encontrada en esta raza.
- 2) Al analizar el cromosoma Y en los animales de Lidia, se obtuvieron 5 haplotipos exclusivos de esta raza y no presentes en ninguna otra raza bovina presente en este estudio.
- 3) En términos de conservación, sería mejor no tener en cuenta a la raza bovina de Lidia como una unidad sino considerar las castas, o mejor aún cada uno de los encastes en los que está estructurada esta raza, como el objetivo de los esfuerzos de conservación.

#### **Artículo 2. *Animal Genetics*, 2017 DOI: 10.1111/age.12549. In press.**

- 4) El análisis de un gran conjunto de datos de haplotipos estandarizados (en el cromosoma Y bovino) en 57 razas bovinas españolas, europeas y africanas, mostró un nuevo haplogrupo Y1.2 que se encuentra exclusivamente en las razas españolas, y entre ellas, presente en la Casta Vistahermosa de la raza bovina de Lidia.
- 5) La presencia de haplotipos del cromosoma Y que se encuentran exclusivamente en el ganado español refuerzan la importancia del ganado local y menos intensamente seleccionados como reservas de diversidad genética. Asimismo apoya la teoría de que España es una región donde la introgresión de los uros en el ganado doméstico y en donde eventos de domesticación secundaria podría haber ocurrido.

## **Conclusiones del CAPÍTULO II**

**Artículo 3. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2016. 133: 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198.**

- 6) El testaje de la ficha de calificación lineal estandarizada del comportamiento (CLEC) a partir de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad, ha evidenciado que se dispone de un instrumento viable y fiable para medir el comportamiento relacionado con la bravura en bovinos de lidia, siendo muy útil a la hora de utilizar los datos de comportamiento recogidos en esta ficha para la determinación de las heredabilidades y correlaciones genéticas entre variables, ya que la objetividad de esta escala de baremación ha permitido estimar los parámetros genéticos de forma fiable y nos permitirá la valoración genética de los reproductores con el fin tanto de seleccionar los individuos superiores, como de detectar los defectos comportamentales de la descendencia.
- 7) Los resultados obtenidos han mostrado que los valores de heredabilidad de los caracteres comportamentales son medio-altos, en concordancia con valores encontrados en estudios previos. Estos valores muestran buenas posibilidades de avance en un programa de selección, al poder determinar el mérito genético de los reproductores con precisiones suficientemente elevadas como para suponer una ventaja respecto al sistema de selección fenotípica tradicionalmente utilizada. Todo ello contribuirá a mejorar de forma significativa el progreso genético en esta población, en el momento que se seleccionen animales en función de su valor genético.
- 8) Las correlaciones genéticas entre las distintas variables etológicas de la ficha de calificación lineal estandarizada del comportamiento, han resultado en su mayoría positivas y de rango medio-alto, habiéndose podido agrupar estas variables para conformar tres índices genéticos de selección (bravura, fuerza y movilidad), esperándose que por el efecto aditivo que posee cada una de estas variables, la respuesta a la selección sea alta.

### **Conclusiones del CAPÍTULO III**

**Artículo 4. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.**

- 9) Tras analizar varios polimorfismos en tres genes (CAPN1, CAST y DGAT1) relacionados con la calidad de la carne en el ganado de Lidia y algunos de sus principales encastes, se demostró que la raza bovina de Lidia presentó alta frecuencia de los alelos asociados con la carne más tierna y mayor contenido en grasa que otras poblaciones. Sería interesante llevar a cabo una profunda investigación de nuevos polimorfismos en los genes asociados con la calidad de la carne y la necesidad de llevar a cabo los análisis de asociación entre los SNPs segregados en el ganado de Lidia y los rasgos de interés económico en esta raza.



## CONCLUSIONS

### CHAPTER I:

#### **Paper 1. Animal Genetics, 2015. 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278**

- 1) We can consider the Lidia cattle breed as a racial grouping of different populations and origins. The special breeding objective (selection of aggressive behavior) and reproduction of Lidia cattle breed (consanguineous matings within subpopulations), as well as the diverse origin of its five founding castes have contributed to provide the great genetic variability found in this breed.
- 2) When analyzing the Y chromosome of Lidia animals, 5 exclusive haplotypes of this breed and not present in any other bovine breed analyzed in this study were obtained.
- 3) In terms of conservation, it would be better not to consider this breed as a unit but to consider the caste, or even better the encaste, as the target of putative conservation efforts.

#### **Paper 2. Animal Genetics, 2017 (In production). DOI: 10.1111/age.12549**

- 4) Analysis of a larger dataset of standardized haplotypes from 57 populations, from Spain, other European countries, and Africa, showed the new Y1.2 haplogroup to be exclusively found in Spanish breeds, and among them, at Vistahermosa caste.
- 5) This finding reinforces the importance of local Spanish cattle as reservoirs of genetic diversity, as well as the importance of Iberian Peninsula in the history of cattle. It also supports the theory that Spain is a region where either the aurochs introgression into domestic livestock and secondary domestication events might have occurred.



**CHAPTER II:**

**Paper 3. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2016. 133: 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198.**

- 6) The testing of the standardized linear behavior scoring system (CLEC) based on repeatability and reproducibility parameters, has shown that it is a viable and reliable instrument to measure the behavior related to ferocity in Lidia breed. It is also very useful when using the collected behavior data to determine genetic heritabilities and correlations between variables, since the objectivity of this scoring scale has allowed to estimate genetic parameters reliably. Likewise, it will allow the genetic evaluation of the breeding stock in order to both select the superior individuals and to detect the behavioral defects of the progeny.
- 7) The obtained results have shown that the values of heritability of the behavioral characters are medium-high, in agreement with values found in previous studies. These values show good possibilities of success in a selection program, since it is possible to determine the genetic merit of the breeding stock with sufficiently high precisions as an advantage over the traditionally used phenotypic selection system. All this will contribute to a significant improvement of the genetic progress within this population, when the animals are selected according to their genetic value.
- 8) The genetic correlations among the different ethological variables of the behavioural linear standardized scoring system have been mostly positive and mid-high range. These variables have been grouped to obtain three genetic indexes of selection (aggressiveness, strength and mobility), expecting that the response to selection will be high due to the additive effect of each of these variables.

**CHAPTER III:**

**Paper 4. Spanish Journal of Agricultural Research, 2016. Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.**

- 9) After analyzing several polymorphisms in three genes (CAPN1, CAST and DGAT1) related to meat quality in Lidia cattle and some of their main encastes, it was demonstrated that the Lidia breed presented high frequency of alleles associated with more tender meat and higher fat content than other populations. It would be interesting to carry out an in depth search for new polymorphisms in genes associated with meat quality and the need of performing association analyses between the SNPs segregating in Lidia cattle and traits of economic interest.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk K., Pokorska J., Makulska J., Earley B. & Mazurek M. (2013) Genetic analysis and evaluation of behavioural traits in cattle. *Livestock Science* 154, 1-12.
- Almenara-Barrios J. & García R. (2011) Escala de evaluación del comportamiento en bovinos de Lidia (EBL-10): Estudios de fiabilidad y validación. *Archivos de Zootecnia* 60, 215-24.
- Amos W. & Balmford A. (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* 87, 257-65.
- Anderung C., Bouwman A., Persson P., Carretero J.M., Ortega A.I., Elburg R., Smith C., Arsuaga J.L., Ellegren H. & Götherström A. (2005) Prehistoric contacts over the Straits of Gibraltar indicated by genetic analysis of Iberian Bronze Age cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8431-5.
- Avilés C., Azor P.J., Pannier L., Hamill R.M., Membrillo A. & Molina A. (2009) New single nucleotide polymorphisms in the mu-calpain gene in Spanish maternal beef breeds. *Animal biotechnology* 20, 161-4.
- Barendse W.J. (2002) DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. In: *World Intellectual Property Organization*. Publication N°. WO 02/064820 A1.
- Barker J.S.F. (2001) Conservation and management of genetic diversity: A domestic animal perspective. *Canadian Journal of Forest Research* 31, 588-95.
- Baumung R., Simianer H. & Hoffmann I. (2004) Genetic diversity studies in farm animals - A survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121, 361-73.
- Beja-Pereira A., Alexandrino P., Bessa I., Carretero Y., Dunner S., Ferrand N., Jordana J., Laloe D., Moazami-Goudarzi K., Sanchez A. & Cañon J. (2003) Genetic characterization of Southwestern European bovine breeds: A historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of Heredity* 94, 243-50.
- Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S., Lari M., Martini A., Ouragh L., Magid A., Atash A., Zsolnai A., Boscato P., Triantaphylidis C., Ploumi K., Sineo L., Mallegni F., Taberlet P., Erhardt G., Sampietro L., Bertranpetit J., Barbujani G., Luikart G. & Bertorelle G. (2006) The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8113-8.
- Bennewitz J. & Meuwissen T.H.E. (2005) A novel method for the estimation of the relative importance of breeds in order to conserve the total genetic variance. *Genetics Selection Evolution* 37, 315-37.
- Beriain M., Horcada A., Lizaso G., Insausti K. & Purroy A. (2011) Meat quality from fighting bulls in Spain. *Revista Científica XXI*, 88-95.
- Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L., Hawkins G.A., Toldo S.S., Fries R., Grosz M.D. & Yoo J. (1994) A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136, 619-39.
- BOE (1992) Real Decreto 176/1992, de 28 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento de espectáculos taurinos.
- BOE (2001) Real Decreto 60/2001, de 26 de Enero, sobre prototipo racial de la raza bovina de Lidia. pp. 5255-61. <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2001-990>.
- Boissy A. (1995) Fear and fearfulness in animals. *The quarterly review of biology* 70, 165-91.
- Boissy A. (1998) Fear and fearfulness in determining behavior. *Genetics and the behavior of domestic animals*.

- Boissy A. & Bouissou M.F. (1995) Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science* 46, 17-31.
- Boleman S.J., Boleman S.L., Miller R.K., Taylor J.F., Cross H.R., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Shackelford S.D., Miller M.F., West R.L., Johnson D.D. & Savell J.W. (1997) Consumer Evaluation of Beef of Known Categories of Tenderness. *Journal of Animal Science* 75, 1521-4.
- Bollongino R., Elsner J., Vigne J. & Burger J. (2008) Y-SNPs do not indicate hybridisation between European aurochs and domestic cattle. *PLoS One* 3.
- Bouchard Jr T.J., Lykken D.T., McGue M., Segal N.L. & Tellegen A. (1990) Sources of human psychological differences: The minnesota study of twins reared apart. *Science* 250, 223-8.
- Bradley D.G., Machugh D.E., Cunningham P. & Loftus R.T. (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5131-5.
- Bulbena A., Gibert M. & Rojo C. (2000) Biometeorología y conducta humana: aspectos metodológicos (pp. 497-507). *Medición Clínica en Psiquiatría y Psicología*. Barcelona: Masson-Salvat.
- Burrow H.M. (1993) The effects of inbreeding in beef cattle. pp. 737-51.
- Burrow H.M. (1997) Measurements of temperament and their relationships with performance traits of beef cattle. *Animal Breeding Abstracts (United Kingdom)*.
- Cabrera R. (2012) Trapío y casta del toro del siglo XXI. *XX Jornadas técnicas de la Asociación de Veterinarios Taurinos*. Santander.
- Cai X., Chen H., Wang S., Xue K. & Lei C. (2006) Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. *Genetics Selection Evolution* 38, 525.
- Calero D. (2008) Estimación de parámetros genéticos y valores de cría de variables etológicas expresadas durante las faenas de tienta y de lidia en dos ganaderías de reses bravas del suroccidente colombiano. *Universidad Nacional de Colombia*. Palmira.
- Calero D., González E. & Durán C. (1997) Parámetros genéticos de características puntuales en el comportamiento durante la tienta o la lidia en reses bravas. *II Congreso Mundial taurino de Veterinaria*. Grupo de investigación del toro de lidia Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.
- Cañón J. (2006) El origen genético del toro de lidia y su relación con el toro actual. pp. 67-98. Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra.
- Cañón J. (2011) Medidas para la protección de encastes en peligro de extinción. *VII Congreso Mundial Taurino de Veterinaria*. Cáceres.
- Cañón J. (2014) Mejora genética en el ganado de lidia. <http://www.ucm.es/info/genetvet>.
- Cañón J., Gutiérrez J. & Vallejo M. (1998) Determinación genética de los caracteres de comportamiento en el ganado de lidia. *Curso sobre el toro de lidia*. Depto. de Producción animal. Universidad Complutense de Madrid.
- Cañón J., Tupac-Yupanqui I., Garcia-Atance M.A., Cortes O., Garcia D., Fernandez J. & Dunner S. (2008) Genetic variation within the Lidia bovine breed. *Animal Genetics* 39, 439-45.
- Carvajal-Carmona L.G., Bermudez N., Olivera-Angel M., Estrada L., Ossa J., Bedoya G. & Ruiz-Linares A. (2003) Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in Colombian criollo cattle (*Bos taurus*). *Genetics* 165, 1457-63.
- Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Stone R.T., Kappes S.M. & Koohmaraie M. (2000) Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *Journal of Animal Science* 78, 560-9.

- Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase Jr C.C., Johnson D.D. & Smith T.P.L. (2006) Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* 84, 520-5.
- Castro B.L.F. (1999) Tienta de machos para simiente. *Memorias del Primer Seminario Nacional en Ganadería de Lidia. Cali, Colombia.*
- Castro J. (2012) Consanguinidad y ganadería de lidia. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/9510/ARTICULOS-RUMIANTES-ARCHIVO/Consanguinidad-y-ganaderia-de-Lidia.html>.
- Ciobanu D.C., Lonergan S.M., Bastiaansen J.W.M., Woollard J.R., Malek M., Hufflonergan E.J., Plastow G.S. & Rothschild M.F. (2002) Evidence for new alleles in calpastatin gene associated with meat quality traits in pigs. . In: *Proceedings of 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France. Communication. Nº 11-10.*
- Cong M., Thompson V.F., Goll D.E. & Antin P.B. (1998) The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 273, 660-6.
- Cortés O. (2008) Análisis de la Variabilidad Genética en la Raza Bovina de Lidia utilizando información Molecular. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.*
- Cortes O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., Fernández J. & Cañón J. (2011) Y chromosome genetic diversity in the Lidia bovine breed: A highly fragmented population. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 128, 491-6.
- Cortés O., Tupac-Yupanqui I., Dunner S., García-Atance M.A., García D., Fernández J. & Cañón J. (2008) Ancestral matrilineages and mitochondrial DNA diversity of the Lidia cattle breed. *Animal Genetics* 39, 649-54.
- Cossio J.M. (1951) Los toros, tratado técnico e histórico. *Ed. Espasa Calpe S.A. Madrid Tomos I-IX.*
- Crossa J., Hernandez C.M., Bretting P., Eberhart S.A. & Taba S. (1993) Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 86, 673-8.
- Cruz J. (1991) *El toro de lidia en biología, en la zootecnia y en la cultura.* Junta de Castilla y León, Consejería de Agricultura y Ganadería.
- Cymbron T., Loftus R.T., Malheiro M.I. & Bradley D.G. (1999) Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266, 597-603.
- Davis M. (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual review of neuroscience* 15, 353-75.
- Dickson D.P., Barr G.R., Johnson L.P. & Wieckert D.A. (1970) Social Dominance and Temperament of Holstein Cows1. *Journal of Dairy Science* 53, 904-7.
- Domecq A. (1994) El toro bravo. Ed. Espasa Calpe. 6ª Edición. Madrid.
- Domínguez-Viveros J., Núñez R., Ramírez R. & Ruiz-Flores A. (2005) Parámetros de poblaciones y evaluaciones genéticas en ganaderías de lidia mexicanas. Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Chapingo, Estado de México.
- Domínguez-Viveros J., Rodríguez Almeida F.A., Núñez-Domínguez R., Ramírez-Valverde R., Ortega Gutiérrez J.A. & Ruiz-Flores A. (2008) Análisis del pedigrí y efectos de la consanguinidad en el comportamiento del ganado de lidia mexicano. . *Archivos de Zootecnia.* 59.
- Durán C. (1999) Principios básicos de la genética aplicables a la cría de ganado de lidia. . *Memorias del Primer Seminario Nacional en Ganadería de Lidia. Cali, Colombia.*



- Epstein H. & Mason I.L. (1984) Cattle. In: Mason IL (eds) *Evolution of Domesticated Animals*. . Longman: London, UK pp 6–27.
- Falcão S., Filho M.R., Magnabosco U.C., Bozzi R. & Lima M.F.A. (2001) Efeitos da Endogamia sobre Características de Reprodução, Crescimento e Valores Genéticos Aditivos de Bovinos da Raça Pardo-Suíça<sup>1</sup>. *Rev. bras. zootec* 30, 83-92.
- Falconer D.S. (1989) *Introduction to Quantitative Genetics*<sup>3</sup> Longman Scientific and Technical Essex Google Scholar.
- Fernández J. (2008) Origen y creación del Toro de Lidia. *VI Jornadas sobre ganado de Lidia*. Ed. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.
- Fernández L. (1959) Los cien puntos de la bravura. *Ganadería* 197, 652-5.
- Fernández L. (1962) El toro bravo. *Ganadería* 226, 209-12.
- Fordyce G., Dodt R.M. & Wythes J.R. (1988) Cattle temperaments in extensive beef herds in northern Queensland. 1. Factors affecting temperament. *Animal Production Science* 28, 683-7.
- Frail C. (1995) El toro, seriedad y razón de la fiesta. *Toro Bravo* 2, 40-1.
- Frisch M.P. & Rodríguez M.M. (2002) Terneza: una característica a tener en cuenta. *revista del Plan Agropecuario*, 18-21.
- Fujita O., Annen Y. & Kitaoka A. (1994) Tsukuba high-and low-emotional strains of rats (*Rattus norvegicus*): an overview. *Behavior Genetics* 24, 389-415.
- García-Martínez D. (2008) Diversidad genética y establecimiento de prioridades en esquemas de conservación. Ejemplo de aplicación en la raza de lidia. *Tesis doctoral. Universidad de Madrid*.
- García-Ramos A. (1981) Reglamentación: Historia de los reglamentos de España y otros países. En: Cossío, J. M. y Díaz-Cañabate, A. *Los toros: tratado técnico e histórico, Tomo V*. Ed. Espasa-Calpe. 3ª edición. Madrid., 499-543.
- García J.I. (2011) La selección a través de los libros genealógicos. Adaptación de la Raza de Lidia a la nueva normativa zootécnica nacional. *VII Congreso Mundial Taurino de Veterinaria*. Cáceres 134-138.
- García R., Almenara-Barrios J., Valdés J., Navarro J.I., Salvador L. & Fernández R. (2002) Evaluación estandarizada de la bravura. *Toroslidia.com. Revista Electrónica de la Unión de Criadores de Toros de Lidia*. Madrid. España.
- García R., Almenara J., Valdés J., Navarro J.I., Salvador L. & Fernández R. (2003) Evaluación estandarizada de la bravura II. Disponible en: *Toroslidia.com. Revista electrónica de la Unión de Criadores de Toros de Lidia*. (15/01/09).
- Gaudioso V., Pérez-Tabernero A. & Sánchez J.M. (1985) Evaluación de la bravura, nobleza y mansedumbre del toro de lidia. *Buiatría Española* 1, 218-32.
- Gaudioso V. & Riols J.A. (1996) Selección y reproducción en el ganado de Lidia. En: *Producciones equinas y de Ganado de Lidia, Cap. XVII. Zootecnia, bases de producción animal*. Ed-Mundiprensa. Madrid.
- Gauly M., Mathiak H., Hoffmann K., Kraus M. & Erhardt G. (2001) Estimating genetic variability in temperamental traits in German Angus and Simmental cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 74, 109-19.
- Ginja C., Telo Da Gama L. & Penedo M.C.T. (2009) Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs. *Journal of Heredity* 100, 148-57.
- Goddard M.E. & Beilharz R.G. (1984) A factor analysis of fearfulness in potential guide dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 12, 253-65.

- González E., Durán C.V. & Domínguez J.F. (1994) Heredabilidad y repetibilidad de la nota de tiente y nota de lidia en una ganadería de reses bravas. *Arch. Zootec* 43, 225-37.
- Gotherstrom A., Anderung C., Hellborg L., Elburg R., Smith C. & Bradley D. (2005) Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proc Biol Sci* 272, 2345 - 50.
- Grandin T. (1998) Objective scoring of animal handling and stunning practices at slaughter plants. *Journal American Veterinary Medical Association* 212, 36-40.
- Haskell M.J., Simm G. & Turner S.P. (2014) Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Frontiers in Genetics* 5, 368.
- Hemsworth P.H., Barnett J.L., Treacy D. & Madgwick P. (1990) The heritability of the trait fear of humans and the association between this trait and subsequent reproductive performance of gilts. *Applied Animal Behaviour Science* 25, 85-95.
- Henson E.L. (1992) In situ conservation of livestock and poultry. *FAO Animal Production and Health paper* 99, FAO/UNEP, 112.
- Herrero E. & Herrero D. (2001) Evolución histórica del Toro Bravo: 10. Salamanca.
- Hewitt G.M. (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - Or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10, 537-49.
- Horcada A., Polvillo O., Valera M. & Juárez M. (2012) Influence of season on intramuscular fatty acid profile of fighting bull. *Agrociencia* 46, 12.
- Janssens S. & Vandepitte W. (2004) Genetic parameters for body measurements and linear type traits in Belgian Bleu du Maine, Suffolk and Texel sheep. *Small Ruminant Research* 54, 13-24.
- Jobling M.A. & Tyler-Smith C. (2003) The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4, 598-612.
- Kagan J., Reznick S. & Snidman N. (1988) Biological bases of childhood shyness. *Science* 240, 167.
- Kappes S. (1999) Utilization of gene mapping information in livestock animals. *Theriogenology* 51, 135-47.
- Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P., Lopez-Corrales N.L. & Beattie C.W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7, 235-49.
- Koohmaraie M. (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science* 43, S193-S201.
- Lanfranchi H. (1992) Historia del Toro Bravo Mexicano. *Asociación Nacional de Criadores de Toros de Lidia. México, D.F.* 401.
- Le Neindre P., Boivin X. & Boissy A. (1996) Handling of extensively kept animals. *Applied Animal Behaviour Science* 49, 73-81.
- Le Neindre P., Trillat G., Sapa J., Menissier F., Bonnet J.N. & Chupin J.M. (1995) Individual differences in docility in Limousin cattle. *Journal of Animal Science* 73, 2249-53.
- Legates J.E., Warwick J.E. & Valenzuela M.T. (1992) *Cría y mejoramiento del ganado*. Interamericana McGraw-Hill.
- Lirón J.P., Bravi C.M., Mirol P.M., Peral - García P. & Giovambattista G. (2006) African matrilineages in American Creole cattle: evidence of two independent continental sources. *Animal Genetics* 37, 379-82.
- Liu W.-S., Mariani P., Beattie C.W., Alexander L.J. & Ponce de León F.A. (2002) A radiation hybrid map for the bovine Y Chromosome. *Mammalian Genome* 13, 320-6.
- Liu W.S., Beattie C.W. & Ponce de León F.A. (2003) Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. *Cytogenetic and genome research* 102, 53-8.

- Liu W.S., Beattie C.W. & Ponce de León F.A. (2004) Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. *Cytogenetic and genome research* 102, 53-8.
- Loftus R., MacHugh D., Bradley D., Sharp P. & Cunningham P. (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2757 - 61.
- Lomillos J.M. (2012) Aplicación de nuevas tecnologías a la caracterización, cría y manejo de ganado vacuno de lidia.
- Love J. (1994) Product acceptability evaluation. In: *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products* (pp. 337-58. Springer.
- MacHugh D.E., Loftus R.T., Cunningham P. & Bradley D.G. (1998) Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29, 333-40.
- MacHugh D.E., Shriver M.D., Loftus R.T., Cunningham P. & Bradley D.G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071-86.
- Madariaga B. (1966) *El toro de lidia*. Alimara.
- Maier R. (2001) *Comportamiento animal: Un enfoque evolutivo y ecológico*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Mannen H., Kohno M., Nagata Y., Tsuji S., Bradley D.G., Yeo J.S., Nyamsamba D., Zagdsuren Y., Yokohama M. & Nomura K. (2004) Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Molecular phylogenetics and evolution* 32, 539-44.
- Mendoza J.L., Markos V.H. & Gonter R. (1978) A new perspective on sequential testing procedures in canonical analysis: A Monte Carlo evaluation. *Multivariate Behavioral Research* 13, 371-82.
- Mezzelani A., Zhang Y., Redaelli L., Castiglioni B., Leone P., Williams J.L., Toldo S.S., Wigger G., Fries R. & Ferretti L. (1995) Chromosomal localization and molecular characterization of 53 cosmid-derived bovine microsatellites. *Mammalian Genome* 6, 629-35.
- Mira F. (1981) El Toro Bravo. Hierros y Encastes. Ed. Guadalquivir S.L. Sevilla.
- Miretti M.M., Dunner S., Naves M., Contel E.P. & Ferro J.A. (2004) Predominant African-derived mtDNA in Caribbean and Brazilian creole cattle is also found in Spanish cattle (*Bos taurus*). *Journal of Heredity* 95, 450-3.
- Miretti M.M., Pereira Jr H.A., Poli M.A., Contel E.P.B. & Ferro J.A. (2002) African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): Evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *Journal of Heredity* 93, 323-30.
- Morton J., Bickerstaffe R., Kent M., Dransfield E. & Keeley G. (1999) Calpain-calpastatin and toughness in *M. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses. *Meat Science* 52, 71-9.
- Murphy W.J., Wilkerson A.J.P., Raudsepp T., Agarwala R., Schäffer A.A., Stanyon R. & Chowdhary B.P. (2006) Novel gene acquisition on carnivore Y chromosomes. *PLoS Genet* 2, e43.
- Nieto L. (1987) Diccionario ilustrado de términos taurinos. Espasa-Calpe. Madrid.
- Nonneman D., Kappes S. & Koohmaraie M. (1999) Rapid communication: A polymorphic microsatellite in the promoter region of the bovine calpastatin gene. *Journal of Animal Science* 77, 3114-5.
- Núñez R., Ramírez R., Ruiz A. & Domínguez-Viveros J. (2004) Heredabilidad para características de conducta en ganado de Lidia. . Publicado en la XXXII Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de Producción Animal., 47-51.

- Ollivier L., Alderson L., Gandini G.C., Foulley J.L., Haley C.S., Joosten R., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A.M., Amigues Y., Boscher M.Y., Russell G., Law A., Davoli R., Russo V., Matassino D., Désautés C., Fimland E., Bagga M., Delgado J.V., Vega-Pla J.L., Martínez A.M., Ramos A.M., Glodek P., Meyer J.N., Plastow G.S., Siggins K.W., Archibald A.L., Milan D., San Cristobal M., Laval G., Hammond K., Cardellino R. & Chevalet C. (2005) An assessment of European pig diversity using molecular markers: Partitioning of diversity among breeds. *Conservation Genetics* 6, 729-41.
- Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W. & Smith T.P.L. (2002) Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 80, 3077-85.
- Palacio J. (2000) Estudio comparativo de la respuesta de adaptación de dos razas bovinas: Parda Alpina y Pirenaica. *PhD, Zaragoza University*, 314p.
- Pardo de Vélaz G. & Cedenio M. (1997) Investigación en salud. *Factores sociales*.<sup>^</sup> *Santafé de Bogotá: McGraw-Hill-Interamericana SA* 1, 344.
- Payne W.J.A. (1970) Cattle Production in the Tropics, 1st edn. *Longman: London*.
- Pelayo R., Penedo M.C.T., Valera M., Molina A., Ginja C., Millon L. & Royo L.J. (2017) Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish 1 native cattle. *Animal Genetics (Accepted)*.
- Pelayo R., Solé M., Sánchez M.J., Molina A. & Valera M. (2016a) Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters. *Journal of Animal Breeding and Genetics*.
- Pelayo R., Valera M., Molina A. & Avilés C.B. (2016b) Short communication: Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research* 14, 04-2.
- Pelayo R., Valera M., Molina A. & Royo L.J. (2015) Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain. *Animal Genetics* 46, 312-5.
- Perez-Pardal L., Royo L., Beja-Pereira A., Chen S., Cantet R. & Traore A. (2010) Multiple paternal origins of domestic cattle revealed by Y-specific interspersed multilocus microsatellites. *Heredity (Edinb)* 105, 511 - 9.
- Piedrafito J. & Manteca X. (2002) Mejora genética del comportamiento y del bienestar del ganado rumiante.
- Popelín C. (1966) Los toros desde la barrera. *Madrid, Ediciones Rialp S.A.*
- Purroy A. (1988) *La cría del toro bravo: arte y progreso*. Mundi Prensa Libros SA.
- Purroy A. (2003) Comportamiento del toro de lidia. En el campo, en el ruedo. *Ed. Universidad Pública de Navarra. Pamplona* 267.
- Ramírez-Valverde V.R., Domínguez-Viveros J., Núñez-Domínguez D.R., Ruiz-Flores A. & Guevara R.J. (2004) Descripción de la consanguinidad y sus efectos en una ganadería de lidia.
- Reese W.G., Newton J.E.O. & Angel C. (1983) A canine model of psychopathology. In: *Psychosomatic Medicine* (pp. 25-31. Springer.
- Rodríguez A. (2002) Prototipos raciales del vacuno de lidia. *Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid*.
- Rogan M.T. & LeDoux J.E. (1996) Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell* 85, 469-75.
- Ruiz-Flores A., Núñez-Domínguez R., Ramírez-Valverde R., Domínguez-Viveros J., Mendoza-Domínguez M. & Martínez-Cuevas E. (2006) Niveles y efectos de la consanguinidad en variables de crecimiento y reproductivas en bovinos Tropicarne y Suizo Europeo.

- Sánchez-Algaba H.M. (1979) Influencia de la ecología sobre el toro de lidia. *Avances en alimentación y mejora animal*. 20, 3-6.
- Sánchez-Belda A. (1952) Trapío y biotipo del toro bravo. *Ganadería*. 106, 181-4.
- Sánchez-Belda A. (1954) Dificultades intrínsecas de la obtención del toro bravo. *Ganadería*. 131, 246-8.
- Sánchez A., Mora H., Frías J. & Balbas J.Á. (1980) Geografía del Toro de Lidia. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Sánchez J.M. (1988) *Contribución al estudio de diferentes sistemas de explotación en ganado bovino: valoración productiva del toro de lidia*.
- Sánchez M.J., Gómez M.D., Molina A. & Valera M. (2013) Genetic analyses for linear conformation traits in Pura Raza Español horses. *Livestock Science* 157, 57-64.
- Santa-Martina J. (2001) El toro de Lidia: conservación de los recursos genéticos. *Archivos de Zootecnia* 50, 35-40.
- Sanz-Egaña C.S. (1942) La bravura del toro de lidia. *Espasa-Calpe. Madrid*.
- Sartori C. & Mantovani R. (2010) Genetics of fighting ability in cattle using data from the traditional battle contest of the Valdostana breed. *Journal of Animal Science* 88, 3206-13.
- Schmidt S.E., Neuendorff D.A., Riley D.G., Vann R.C., Willard S.T., Welsh Jr T.H. & Randel R.D. (2014) Genetic parameters of three methods of temperament evaluation of Brahman calves. *J. Anim. Sci* 92, 3082-7.
- Silva B., Gonzalo A. & Cañón J. (2002) Genetic parameters of behavioural traits in the bovine (*Bos taurus*). pp. 83-6.
- Silva B., Gonzalo A. & Cañón J. (2006) Genetic parameters of aggressiveness, ferocity and mobility in the fighting bull breed. *Animal Research* 55, 65-70.
- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L., Brown L.G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S.-F., Latrielle P., Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfing T., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S.-P., Waterston R.H., Wilson R.K., Rozen S. & Page D.C. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825-37.
- Smith C. (1984) Economic aspects of conserving animal genetic resources. *Resources Information, FAO-UNEP Food and Agriculture Organization, Roma*.
- Smith T.P.L., Casas E., Rexroad III C.E., Kappes S.M. & Keele J.W. (2000) Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of Animal Science* 78, 2589-94.
- Sotillo F., Ramírez de la Fe A.R. & Sotillo J.L. (1996) Biotipología del Toro de Lidia. *Producciones equinas y de ganado de Lidia, Zootecnia, bases de producción animal, tomo XI. Ed. Mundiprensa. Madrid. Cap. XV*.
- Svensson E. & Götherström A. (2008) Temporal fluctuations of Y-chromosomal variation in *Bos taurus*. *Biology Letters* 4, 752-4.
- Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zühlke H. & Fries R. (2003) DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics* 34, 354-7.
- Troy C., MacHugh D., Bailey J., Magee D., Loftus R. & Cunningham P. (2001) Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410, 1088 - 91.
- Upadhyay M.R., Chen W., Lenstra J.A., Goderie C.R.J., Machugh D.E., Park S.D.E., Magee D.A., Matassino D., Ciani F., Megens H.J., Van Arendonk J.A.M., Groenen M.A.M.,

- Marsan P.A., Balteanu V., Dunner S., Garcia J.F., Ginja C. & Kantanen J. (2016) Genetic origin, admixture and population history of aurochs (*Bos primigenius*) and primitive European cattle. *Heredity* 118, 169-76.
- Vaiman D., Imam-Ghali M., Moazami-Goudarzi K., Guérin G., Grohs C., Levéziel H. & Saïdi-Mehtar N. (1994) Conservation of a syntenic group of microsatellite loci between cattle and sheep. *Mammalian Genome* 5, 310-4.
- Vallejo M., Gonzalo A. & Cañón J. (2001) Relaciones entre los caracteres de comportamiento del toro de lidia. *Revista Toro Bravo. Unión de Criadores de Toros de Lidia. Madrid, España*. 28, 29 - 33.
- Vallender E.J. & Lahn B.T. (2004) How mammalian sex chromosomes acquired their peculiar gene content. *BioEssays* 26, 159-69.
- Van Hooft W.F., Groen A.F. & Prins H.H.T. (2002) Phylogeography of the African buffalo based on mitochondrial and Y - chromosomal loci: Pleistocene origin and population expansion of the Cape buffalo subspecies. *Molecular Ecology* 11, 267-79.
- Viforcós M. (1992) *El León barroco: los regocijos taurinos*. León: Universidad de León, Secretariado de Publicaciones, 1992.
- White S.N., Casas E., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase Jr C.C., Johnson D.D., Keele J.W. & Smith T.P.L. (2005) A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science* 83, 2001-8.
- Zamora J.A. (2008) Caracterización genética de poblaciones de ganado de lidia para la búsqueda de loci asociados con bravura. . *Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en biotecnología genómica*.



# **LISTADO DE PUBLICACIONES**







## 8. LISTADO DE PUBLICACIONES

En esta sección se presenta un listado en el que se recogen todas las publicaciones a las que ha dado lugar esta Tesis Doctoral, a nivel nacional e internacional.

### 8.1 PUBLICACIONES EN REVISTAS CON ÍNDICE DE IMPACTO (JCR)

AUTORES: **Pelayo R.**, Penedo M.C.T, Valera M, Molina A, Ginja C, Royo L.J.

TÍTULO: Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle.

REFERENCIA: Animal Genetics (2017) (Aceppted).

ISSN: 1365-2052 (online)

IF=1.779 (1º cuartil) en Agriculture, Dairy, Animal Science

AUTORES: **Pelayo, R.**, Valera, M., Molina, A., Avilés, C.

TÍTULO: Analysis of polymorphisms in candidate's genes for meat quality in Lidia cattle.

REFERENCIA: Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 4, e04SC02. Doi: 10.5424/sjar/2016144-9279.

ISSN: 2171-9292

IF=0.760 (2º cuartil). 14/55 en Agriculture, multidisciplinary

AUTORES: **Pelayo, R.**, Valera, M., Molina, A., Royo, L. J.

TÍTULO: Contribution of Lidia cattle breed historical castes to the paternal genetic stock of Spain.

REFERENCIA: Animal Genetics (2015) 46 (3): 312-315. Doi: 10.1111/age.12278

ISSN: 1365-2052 (online)

IF=1.779 (1º cuartil) en Agriculture, Dairy, Animal Science

AUTORES: **Pelayo, R.**, Solé, M., Sánchez, M.J., Molina, A. and Valera, A.

TÍTULO: Behavioural linear standardized scoring system of the Lidia cattle breed by testing in herd: estimation of genetic parameters.

REFERENCIA: Journal of Animal Breeding and Genetics (2015) 133(2016): 414-421. Doi: 10.1111/jbg.12198

ISSN: 0931-2668

IF=1.779 (1º cuartil) en Genetics and heredity

## 8.2 CAPÍTULOS DE LIBRO

AUTORES: **Pelayo, R.**, Azor, P.J, Anaya, G., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: Estructura genética de la raza bovina de Lidia.

LIBRO: Libro de proceeding de la XVI Reunión Nacional de Mejora Genética Animal.

EDITA: MERAGEM y Asociación de Criadores y Propietarios de Caballos de Raza Menorquina.

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Formato CD).

EDICIÓN: Grupo de investigación MERAGEM

## 8.3 CONGRESOS INTERNACIONALES

AUTORES: **Pelayo, R.**, Solé, M., Bomba, M., Demyda Peyras, S., Molina, A and Valera, M.

TÍTULO: Estimation of behavioral genetic parameters in the Fighting bull.

CONGRESO: 65<sup>th</sup> Annual Meeting of EAAP.

ENTIDAD ORGANIZADORA: EAAP

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Book of Abstracts of the 65th Annual Meeting of the European Association for Animal Production.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Copenhagen, Denmark

FECHA: 25-28 de Agosto de 2014.

AUTORES: **Pelayo, R.**, Royo, L.J., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: Paternal origins of Toro de Lidia cattle breed historical castes.

CONGRESO: 65<sup>th</sup> Annual Meeting of EAAP.

ENTIDAD ORGANIZADORA: EAAP

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Book of Abstracts of the 65th Annual Meeting of the European Association for Animal Production.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Copenhagen, Denmark

FECHA: 25-28 de Agosto de 2014

AUTORES: **Pelayo, R.**, Azor, P.J., Membrillo, A., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: New Single Nucleotide Polymorphisms in DBH and TH genes related to behaviour in beef cattle breeds.

CONGRESO: 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of EAAP

ENTIDAD ORGANIZADORA: EAAP

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Book of Abstracts of the 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Bratislava, Slovakia

FECHA: 27-31 de Agosto de 2012.

AUTORES: **Pelayo, R.**, Azor, P.J., Avilés, C., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: Polymorphisms of single nucleotide (SNP) in genes related to fighting bull breed meat quality.

CONGRESO: 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of EAAP

ENTIDAD ORGANIZADORA: EAAP

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Book of Abstracts of the 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Bratislava, Slovakia

FECHA: 27-31 de Agosto de 2012.

#### **8.4 CONGRESOS NACIONALES**

AUTORES: **Pelayo, R.**,

TÍTULO: Diversidad haplotípica en el cromosoma Y en la raza bovina de Lidia.

CONGRESO: Tauromaquia en Córdoba: ecología, turismo, cultura y derecho.

ENTIDAD ORGANIZADORA: Fundación Cajasol

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Ponencia oral

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba

FECHA: 19 de Abril de 2016

AUTORES: **Pelayo, R.**,

TÍTULO: Diversidad haplotípica en el cromosoma Y en la raza de Lidia.

CONGRESO: XII Symposium del Toro de Lidia

ENTIDAD ORGANIZADORA: Colegio de Veterinarios de Badajoz.

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Ponencia oral

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Zafra (Badajoz)

FECHA: 22-24 de Octubre de 2015.

AUTORES: **Pelayo, R.**, Solé, M., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: Sistema de calificación lineal estandarizado para el comportamiento en el toro de Lidia: estimación de parámetros genéticos.

CONGRESO: IV Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba.

ENTIDAD ORGANIZADORA: Universidad de Córdoba

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba

FECHA: 18-19 de Noviembre de 2014

AUTORES: **Pelayo, R.**

TÍTULO: Diversidad haplotípica del cromosoma Y en la raza de Lidia.

CONGRESO: II Congreso Científico de Investigadores en Formación en agroalimentación de la eidA3.

ENTIDAD ORGANIZADORA: Universidad de Córdoba

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba

FECHA: 9-10 de Abril de 2013.

AUTORES: **Pelayo, R.**, Azor, P.J., Avilés, C., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: Polimorfismos de tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) en los genes CAPN1, CAST y DGAT1 en la raza de Lidia.

CONGRESO: IV Congreso Nacional de la Carne de Vacuno “Europa y sus ganaderos a través de la PAC y los productos de calidad diferenciada”.

ENTIDAD ORGANIZADORA: INVAC (Organización Interprofesional de la Carne de Vacuno de Calidad)

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas del IV Congreso Nacional de carne de vacuno.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid

FECHA: 21-22 de Junio de 2012

AUTORES: **Pelayo, R.**, Azor, P.J, Anaya, G., Molina, A., Valera, M.

TÍTULO: Estructura genética de la raza bovina de Lidia.

CONGRESO: XVI Reunión Nacional de Mejora Genética Animal.

ENTIDAD ORGANIZADORA: MERAGEM- Asociación de Criadores y Propietarios de Caballos de Raza Menorquina.

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de resúmenes

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Ciutadella de Menorca

FECHA: 31 de Mayo al 2 de Junio de 2012

AUTORES: Avilés, C., Anaya, G., Membrillo, A., **Pelayo, R.**, Peña, F., Molina, A.

TÍTULO: Determinación de la calidad potencial de la carne mediante marcadores moleculares en el LDGV del Grupo Meragem.

CONGRESO: Feria de ganadería-FEGASUR 2012.

ENTIDAD ORGANIZADORA: Comité Organizador de FEGASUR

PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Jerez de la Frontera (Cádiz)

FECHA: 9-12 de Noviembre de 2012

AUTORES: **Pelayo, R.**

TÍTULO: Análisis genético del temperamento en razas bovinas: vacuno de aptitud cárnica y toro de Lidia.

CONGRESO: I Congreso Científico de Investigadores en Formación en agroalimentación de la eida3 y II Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba.

ENTIDAD ORGANIZADORA: Universidad de Córdoba, PUBLICACIÓN (ISSN/ISBN): Libro de actas

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba

FECHA: 8-9 de Mayo de 2012





Universidad de Córdoba  
Departamento de Genética

